

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Mia Zaračko

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Mia Zaračko

SINTEZA I KARAKTERIZACIJA NANOKOMPOZITA SREBRA
I HUMINSKIH KISELINA

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof.dr.sc. Tomislav Bolanča

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof.dr.sc. Tomislav Bolanča

doc.dr.sc. Šime Ukić

dr.sc. Petar Kassal

Zagreb, srpanj 2017.

*Ovaj rad izrađen je na Zavodu za bioanalitiku i kemiju okoliša
Sveučilišta Nikole Kopernika u Torunu, Poljska,
u sklopu CEEPUS projekta mobilnosti*

Najveće hvala dr.hab.ing. Myroslavu Sprynskom na predloženoj temi mog diplomskog rada, dragocjenoj pomoći, savjetima i dugim raspravama koje su mi otkrile novi pogled na svijet kemije.

Hvala prof.dr. sc. Tomislavu Bolanči i prof.dr.hab.Boguslawu Buszewskom, bez njih moja CEEPUS mobilnost ne bi bila moguća.

Hvala doc.dr.sc. Šimi Ukiću na pomoći i savjetima prilikom pisanja mog rada.

Konačno, posebno hvala mojim najdražima-roditeljima, sestri, Ivanu i Benu. Vi ste tim koji uvijek navija za mene i moja vječna motivacija.

Hvala!

Sažetak

Cilj ovog rada je sinteza nanokompozita srebra i huminske kiseline primjenom metode imobilizacije srebra na modificiranu huminsku kiselinu iz vodene otopine. Određeni su optimalni uvjeti za sintezu: različito vrijeme kontakta otopine Ag^+ iona i huminske kiseline (kinetika), različite inicijalne pH vrijednosti te inicijalne koncentracije Ag^+ iona. Za istraživanje mehanizma adsorpcije/precipitacije srebra na huminsku kiselinu korišteni su različiti kinetički modeli kojima su opisani eksperimentalni rezultati: model nultog, prvog, pseudo prvog i pseudo drugog reda.

Srebrne nanočestice sintetizirane su iz soli srebrova nitrata, AgNO_3 u prisutnosti huminske kiseline koja ima ulogu stabilizatora i reducensa srebra iz ionskog oblika Ag^+ u metalni oblik Ag^0 koji odgovara formi nanočestica. Prije sinteze, huminska kiselina prevodi se u netopljiv oblik termičkom metodom prema Sekiju i Suzukiju^[20] čime se olakšava uklanjanje sintetiziranog nanokompozita od srebra preostalog u vodenoj otopini. Primjenom plamene atomske apsorpcijske spektrofotometrije provodi se analiza uklanjanja srebra mjerenjem koncentracije rezidualnog srebra nakon sinteze.

Nemodificirana i modificirana huminska kiselina te sintetizirani nanokompozit karakterizirani su različitim instrumentalnim metodama: elementarna analiza, termogravimetrijska analiza, infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom, rendgenska difrakcija te skenirajuća elektronska mikroskopija s EDX detektorom. Konačno, primjenom disk-difuzijske metode i metode minimalne inhibitorne koncentracije procijenjeno je antimikrobiološko djelovanje nanokompozita na sedam testiranih bakterija: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* i *Acinetobacter baumannii*.

Ključne riječi: nanočestice srebra, huminska kiselina, nanokompozit, kinetički modeli

Summary

The main aim of this work was preparation (synthesis) of silver and humic acids nanocomposites by silver immobilization on modified humic acids in aqueous solution. Effect of various parameters on synthesis was evaluated: contact time between Ag^+ and humic acid (kinetic studies), initial pH value, and concentration of silver ion. Experimental data was approximated by different kinetic models: zero-order, first-order, pseudo first-order, and pseudo second-order.

Silver nanoparticles were synthesized from silver nitrate salt, AgNO_3 , in presence of humic acid. Humic acid has role of a stabilizing and reducing agent that converts silver from ionic Ag^+ form into Ag^0 one which corresponds to nanoparticle form. Before synthesis, humic acid was modified into insoluble form using thermal method developed by Seki and Suzuki^[20] in order to simplify the separation of synthesized nanocomposite and residual silver in aqueous solution. Flame atomic absorption spectrophotometry was applied for analysis of silver removal: silver concentration after the synthesis (residual silver concentration) was measured.

Non-modified humic acid, modified humic acid and synthesized nanocomposite were characterized using different instrumental methods: elemental analysis, thermogravimetric analysis, Fourier transform infrared spectroscopy, X-ray diffraction, and scanning electron microscopy with EDX detector. Finally, well diffusion method and minimal inhibitory concentration method were used to evaluate antimicrobial activity of nanocomposite against seven selected bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*.

Key words: silver nanoparticles, humic acid, nanocomposite, kinetic models

Sadržaj

1.	UVOD	1
2.	OPĆI DIO	2
2.1	Nanotehnologija i nanočestice	2
2.2	Svojstva nanočestica	2
2.3	Klasifikacija nanočestica	3
2.3.1	Dimenzionalnost.....	3
2.3.2	Sastav nanočestica	4
2.3.3	Morfološka svojstva nanočestica.....	5
2.3.4	Uniformnost i aglomeracija	5
2.4	Sinteza nanomaterijala.....	6
2.5	Stabilizacija nanočestica.....	7
2.6	Primjena nanočestica	8
2.6.1	Biologija i medicina	9
2.6.2	Kataliza.....	9
2.6.3	Elektronika	9
3.	NANOČESTICE SREBRA	11
3.1	Sinteza nanočestica srebra	11
3.1.1	Kemijska sinteza.....	11
3.1.2	Fizikalna sinteza	13
3.1.3	Biološka sinteza.....	15
3.2	Svojstva nanočestica srebra	16
3.2.1	Antimikrobiološko djelovanje nanočestica srebra.....	16
3.2.2	Mehanizam antimikrobiološkog djelovanja	17
3.3	Primjena srebrnih nanočestica	18
3.3.1	Primjeri primjene srebrnih nanočestica	18
3.4	Toksična svojstva srebrnih nanočestica	21
4.	HUMINSKE KISELINE	22
4.1	Struktura i kemijski sastav	22
4.2	Modifikacija huminskih kiselina i uporaba	23
4.3	Kompozit srebrne nanočestice/huminske kiseline (AgNČ/HK)	25
5.	MATERIJALI I METODE.....	27
5.1	Adsorbens.....	27

5.2	Kemikalije	27
5.3	Instrumentacija	27
5.4	Modifikacija huminskih kiselina	28
5.5	Niz eksperimenata.....	28
5.5.1	Utjecaj vremena kontakta (kinetika).....	28
5.5.2	Primijenjeni kinetički modeli	29
5.5.3	Utjecaj pH.....	30
5.5.4	Utjecaj početne koncentracije Ag ⁺ iona	31
5.6	Analiza uklanjanja metala.....	31
5.6.1	Plamena atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS)	31
5.7	Karakterizacija huminske kiseline i nanokompozita AgNČ/MHK	32
5.8	Analiza antimikrobiološkog djelovanja kompozita AgNČ/MHK	34
5.8.1	Disk-difuzijska metoda.....	35
5.8.2	Metoda minimalne inhibitorne koncentracije.....	35
6.	REZULTATI I OBRADA.....	37
6.1	Kalibracijski dijagram analize Ag ⁺ iona	37
6.2.	Utjecaj vremena kontakta (kinetika)	38
6.3.	Utjecaj inicijalne pH vrijednosti	42
6.4	Utjecaj početne koncentracije Ag ⁺ iona	43
6.5	Karakterizacija huminskih kiselina i nanokompozita AgNČ/MHK	44
6.5.1	Elementarna analiza (C,N,H)	44
6.5.2	Termogravimetrijska analiza (TGA)	45
6.5.3	Infracrvena spektrometrija s Fourierovom transformacijom signala (FTIR)	47
6.5.4	Skenirajuća elektronska mikroskopija s EDX detektorom	48
6.5.5	Rendgenska difrakcija (XRD)	54
6.6	Antimikrobiološko djelovanje nanokompozita AgNČ/MHK	56
6.6.1	Metoda minimalne inhibitorne koncentracije.....	56
6.6.2	Analiza disk-difuzijskom metodom.....	58
7.	ZAKLJUČAK.....	60
8.	POPIS SIMBOLA	62
9.	LITERATURA.....	63
10.	ŽIVOTOPIS.....	65

1. UVOD

Rast stanovništva, industrije i urbanizacije doveo je do pojave novih bolesti povezanih s onečišćenim zrakom, vodom i tlom. U borbi protiv štetnih bakterija i bolesti koje uzrokuju, antibiotici su se do sada pokazali učinkovitim, ali razvoj bakterija i rast otpornosti prema tim antibioticima raste toliko brzo da se nova sredstva antimikrobiološkog djelovanja konstantno istražuju. Temeljna uporaba nanočestica srebra temelji se upravo na njihovom antimikrobiološkom djelovanju. Uporaba srebra u funkciji higijene i dezinfekcije poznata je već više od 2000 godina, a važna činjenica je da bakterije još nisu pronašle način kako se oduprijeti njihovom djelovanju.

Sve veća uporaba srebra povećava i mogućnost njegove akumulacije u okolišu i izazivanje neželjenih posljedica. Problem predstavlja njihovo toksično djelovanje u ionskom obliku, stoga je značajan napor uložen je kako bi se istražili materijali i okolišni parametri koji mogu kontrolirati njegovo ponašanje i utjecaj na okoliš.

Kada srebrne nanočestice uđu u okoliš, susreću se s nizom varijacija u temperaturi, pH, izloženosti svjetlosti, ionskoj jakosti, koncentraciji kisika i organske tvari. Svi ti parametri utječu na stabilnost nanočestica i imaju potencijal za izazivanjem disocijacije srebra u ionski oblik, Ag^+ . Dakle, potreban je agens koji bi kontrolirao njihovo ponašanje.

Postojeće tehnike nisu specifične za uklanjanje metalnih iona stoga se često pribjegava nekonvencionalnim metodama kao što je stvaranje kompleksa s organskim tvarima koje imaju mogućnost kontrole za okoliš problematičnih komponenti.

Huminske kiseline su kompleksne prirodne komponente koje sadrže velik broj funkcionalnih skupina te se iz tog razloga pokazuju kao dobar adsorbent. To ih čini ekološki važnima kada je u pitanju kruženje metala u prirodi. Na svoju površinu mogu smještati metalne ione kao što su Ag^+ ioni postupkom adsorpcije ili precipitacije čineći stabilne komplekse te ih sporo i kontrolirano otpuštati. Na taj način reduciraju toksičnost i mogućnost akumulacije štetnog oblika srebra u okolišu.

2. OPĆI DIO

2.1 Nanotehnologija i nanočestice

Uporaba nanomaterijala seže daleko u prošlost unatoč neznanju o veličini čestica i posebnostima koje nano razina posjeduje. Prefiks "nano" potječe od grčke riječi "nanos" što u prijevodu znači "patuljak" te označava milijarditi dio (10^{-9}) mjerne jedinice^[1]. Ideja o nanotehnologiji i manipulaciji na nanorazini svoj formalni početak veže uz govor Richarda Feynmana koji na znanstvenom skupu 1959. godine postavlja pitanje: "Što bi se dogodilo kada bismo mogli atome složiti na točno željeni način?". Svojim govorom izazvao je interes kemičara i fizičara čija su istraživanja dovela do revolucionarnih otkrića nanorazine.

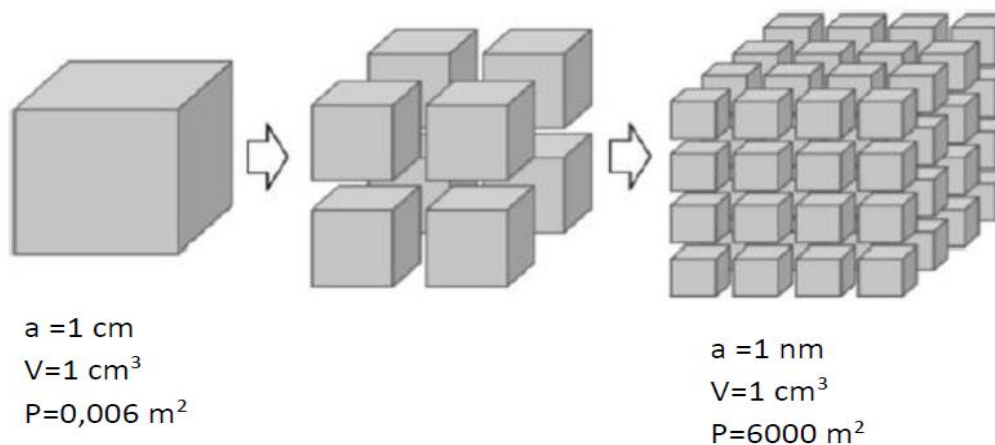
2.2 Svojstva nanočestica

Nanočestice su umanjeni oblici nekog elementa čija barem jedna dimenzija je na razini 1-100 nm. Takve čestice zadržale su sva svojstva tog elementa, ali i poprimile neke posebnosti. Manipulacijom atoma, molekula i supramolekula na nanorazini omogućuje se stvaranje novih materijala s poboljšanim ili potpuno novim svojstvima.

Dva su ključna razloga zašto se nanomaterijali ponašaju drugačije od makromaterijala: površinski i kvantni efekt^[1]. Navedene pojave utječu na specifična fizikalna, kemijska i biološka svojstva nanočestica kojima se razlikuju od materijala u makro veličini. Važna je činjenica da se mala dimenzija može ostvariti s bilo kojom vrstom materijala (metal, keramika, staklo, polimer ili kompozit), a svojstva takvih materijala mogu biti kontrolirana vrlo tankim površinskim slojem atoma što utječe na drugačija svojstva u odnosu na makrorazinu. Atomi koji se nalaze na površini nanočestica pokazuju drugačija svojstva od atoma u unutrašnjost i upravo je taj površinski dio odgovoran za specifična svojstva. Također, površina nanočestice ima ključnu ulogu jer taj dio prvi izložen okolišu.

Efekt kvantne veličine vezan je uz neuobičajena svojstva vrlo malih komponenti koja se javljaju zbog ograničenog kretanja elektrona u jednoj, dvije ili tri dimenzije^[2]. Taj efekt nije izražen prelazeći s makro na mikro razinu, ali postaje izražen na nanometarskoj razini.

Posebna svojstva nanočestica prvenstveno se pripisuju vrlo velikom omjeru površine u odnosu na volumen.



Slika 1: Povećanje specifične površine smanjenjem dimenzija čestica

Na slici 1. prikazano je da smanjenjem dimenzija čestica dolazi do povećanja specifične površine. Svaki put kada se kocka podijeli na manje dijelove, volumen ostaje konstantan dok se površina znatno poveća. Smanjenjem dimenzija dolazi do promjene omjera atoma na površini i u unutrašnjosti čestice. Na makroskali većina atoma nalazi se u unutrašnjosti dok na nanorazini glavnina atoma nalazi se na površini. Rezultat toga je da su čestice nanorazine zbog velike specifične površine i izloženosti većeg broja atoma reaktivnije od onih na makrorazini. Drugim riječima, to znači da će nanočestica nekog materijala određenog promjera imati više izloženih atoma u površinskom dijelu i biti reaktivnija od čestice koja je većeg promjera i s manje izloženih atoma.

2.3 Klasifikacija nanočestica

U posljednjih nekoliko desetljeća, otkrivene su različite vrste nanočestica i iz tog razloga nužna je njihova klasifikacija. Nanočestice se razvrstavaju s obzirom na: dimenzionalnost, sastav, morfološka svojstva, uniformnost i aglomeraciju^[3].

2.3.1 Dimenzionalnost

Ovisno o broju dimenzija u kojima se pojavljuje neka nano-veličina, razlikujemo nultodimenzionalne (0D), jednodimenzionalne (1D), dvodimenzionalne (2D) i trodimenzionalne (3D) nanomaterijale. Shematski prikaz kao i očekivana svojstva nanomaterijala s obzirom na dimenzionalnost koja su do sada uvrđena, prikazana su na slici 2.









Slika 2: Podjela nanomaterijala s obzirom na dimenzionalnost

2.3.2 Sastav nanočestica

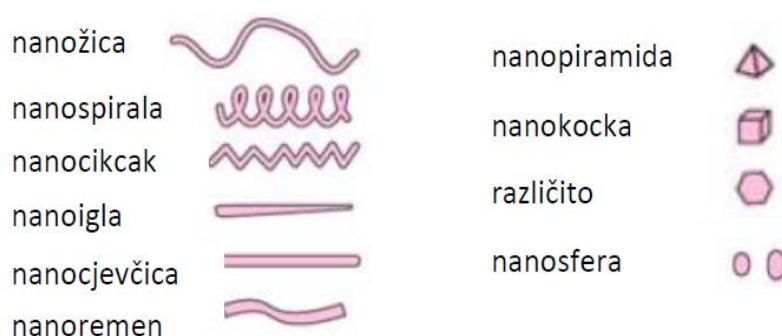
Nanočestice mogu biti sastavljene od jednog materijala ili biti kompozit sastavljen od nekoliko komponenti (tablica 1). Čisti jednokomponentni nanomaterijali danas se vrlo lako mogu sintetizirati, no u prirodi nanočestice pronalazimo kao aglomeracije materijala različitog sastava.

Tablica 1. Primjeri nanočestica s obzirom na sastav

Jednokomponentni nanomaterijal	Kompozit
kompaktan 	premazan 
šuplji 	oklopljen 
	"barkod" 
	miješan 

2.3.3 Morfološka svojstva nanočestica

Nanočestice mogu biti različitog oblika i veličine, a imena dobivaju upravo prema svojem obliku. Primjerice, postoje nanocijevi koje, naravno, imaju cjevasti oblik, zatim nanošipke, nanotrake, nanovlakna, nanokocke te ostali oblici prikazani na slici 3. Sferične nanočestice s najmanjim omjerom površine i volumena smatraju se termodinamički najstabilnijima. Različiti oblici ovise o njihovoj interakciji sa stabilizatorima, prirodi materijala i procesu sinteze^[3].



Slika 3: Različiti oblici nanočestica

2.3.4 Uniformnost i aglomeracija

Ovisno o kemijskim i elektromagnetskim svojstvima, nanočestice mogu biti u obliku raspršenog aerosola, kao suspenzije/koloidi ili formirati aglomerate^[3]. Primjerice, nanočestice s magnetskim svojstvima imaju tendenciju za aglomeracijom, a kako bi se uklonila ta pojava potrebno je na površinu nanočestice nanijeti materijal koji nije magnetičan čime se eliminiraju privlačne sile između čestica koje dovode do aglomeracije. U pravilu, aglomeracija nanočestica nastoji se spriječiti jer se u tom slučaju nanočestice ponašaju kao makročestice, a što su manjeg oblika su aktivnije.

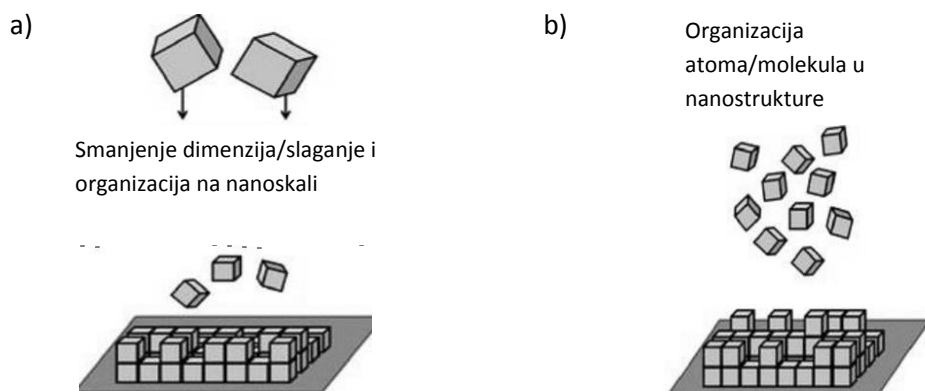
Prilikom sinteze nanočestica osnovni cilj je dobiti nanočestice uniformne veličine, oblika i jednolike raspodjele jer će se na taj način dobiti homogeni materijal koji pokazuje jednolika svojstva. Iz tog razloga proces sinteze mora biti strogo kontroliran.

2.4 Sinteza nanomaterijala

Veliki interes za specifičnim svojstvima nanočestica rezultirao je razvojem brojnih metoda njihove sinteze, no dva osnovna pristupa su *top-down* i *bottom-up* sinteza.

Kod ***top-down*** pristupa nanočestice se dobivaju iz većih komada materijala primjenjujući različite metode uspinjavanja (mljevenje, rezanje, lomljenje, fotolitografija)^[4]. Ove tehnike pružaju mogućnost dobivanja uniformne veličine čestica, jeftine su, dobiva se velika količina čestica, no ključni nedostatak su mogućnost pojave aglomeracije i kontaminacije.

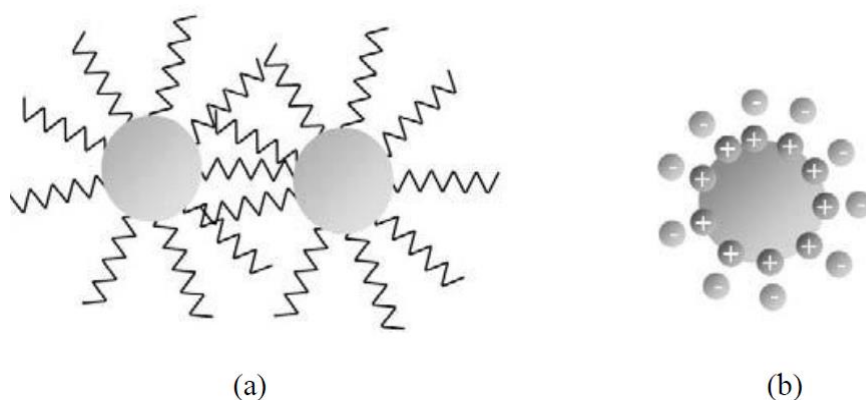
***Bottom-up* tehnike** kao polazište imaju jednostavnije molekule na kojima se odvija nukleacija i rast nanočestica. Navedeni procesi mogu se odvijati u plinovitoj ili tekućoj fazi. Pojedini atomi ili molekule slažu se na uređen način pomoću fizikalnih i kemijskih interakcija tvoreći postupkom samorganizacije složene strukture.



Slika 4. Osnovne strategije sinteze nanomaterijala: a) odozgo prema dolje (engl. *top-down*); b) odozdo prema gore (engl. *bottom up*)

2.5 Stabilizacija nanočestica

Nanočestice raspršene u tekućini predstavljaju koloidnu otopinu koja je termodinamički nestabilna. Kako bi se izbjegla neželjena agregacija kojoj je podložan takav sustav, prilikom sinteze je potrebno koristiti stabilizirajuća sredstva. Dva najčešća načina kojima se može ostvariti stabilizacija su: sterička i elektrostatička stabilizacija (slika 5).



Slika 5: Dva osnovna načina stabilizacije koloida:

(a) sterička i (b) elektrostatička stabilizacija

Sterička stabilizacija podrazumijeva samoorganizaciju dugih lanaca polimernih molekula na površinu metalnih nanočestica uzrokujući prostornu smetnju i udaljavanje čestica. Elektrostatičkom stabilizacijom agregacija se sprječava adsorpcijom iona suprotnog naboja na površinu nanočestice što rezultira stvaranjem dvosloja. Takav proces posljedica je Coulombovog privlačenja koje zahtjeva da naboj otopine bude jednak, ali suprotnog predznaka naboju površine nanočestice^[2].

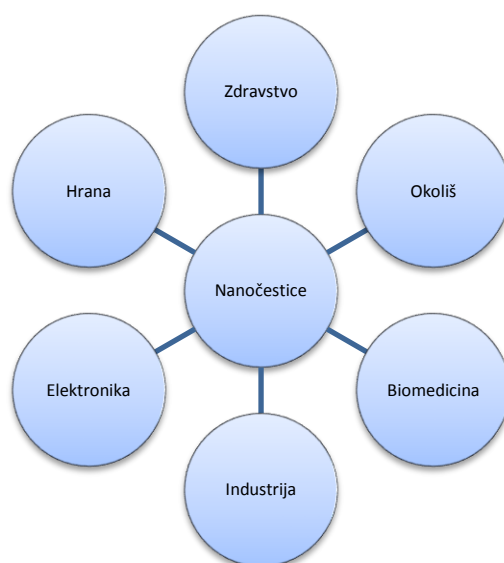
2.6 Primjena nanočestica

Tablica 2. Poboljšana svojstva nanomaterijala u odnosu na makromaterijale

Svojstvo	Svojstvo na nanorazini
Katalitičko	Veća katalitička učinkovitost (veći omjer površina/volumen)
Električno	Veća električna provodnost u keramičkim i magnetskim nanokompozitima, povećana električna otpornost u metalima
Magnetsko	Superparamagnetizam
Mehaničko	Poboljšana žilavost i tvrdoća metala i slitina
Optičko	Spektralni pomak uslijed apsorpcije i fluorescencije; refleksijska svojstva
Steričko	Povećana selektivnost
Biološko	Povećana propusnost kroz biološke membrane; poboljšana biokompatibilnost

Kontinuiran zahtjev za materijalima koji će nuditi superiornija svojstva od tradicionalnih materijala doveo je do ubrzanog razvoja nanotehnologije i nanoznanosti u posljednjih nekoliko desetljeća. Kao što je prethodno objašnjeno, postoje efekti zbog kojih nanoskala pokazuje bolje svojstva u odnosu na makro razinu, a dosad uočena poboljšanja sažeta su u tablici 2.

Jedinstvena svojstva nanomaterijala čine ih atraktivnima za brojne uporabe (slika 6.).



Slika 6: Grane u kojima danas nalazimo primjenu nanočestica

Njihova uporaba česta je u svakodnevnim proizvodima, a u nastavku će biti spomenuta područja najčešće primjene.

2.6.1 Biologija i medicina

Upravljanjem materijala na atomskoj razini otvorili su se novi načini za prevenciju i borbu protiv različitih bolesti. Rana detekcija patogena, virusa i bakterija postala je nužna, a za praćenje njihove količine u organizmu nanočestice su se zbog svojih svojstava pokazale vrlo učinkovitima.

Fluorescentna svojstva nanočestica iskorištena su za poboljšanje postojećih metoda snimanja bioloških uzoraka u svrhu detekciju promjene stanica koje bi mogle ukazati na potencijalnu bolest. Naime, nanočestice su vrlo osjetljive i fotostabilne fluorescentne oznake za biološke uzorke. Zbog njihove male veličine, pogodne su za praćenje stanja organizma na staničnoj razini bez izazivanja značajnih interferencija.

Nanočestice su prepoznate i prema antimikrobiološkom djelovanju, a budući da su u tome najistaknutije srebrne nanočestice, detaljnije će biti objašnjeno u idućem poglavlju posvećenom srebrnim nanočesticama.

2.6.2 Kataliza

Budući da imaju veliku specifičnu površinu, nanočestice pokazuju dobra katalitička svojstva. Istraživanja su pokazala da čak i materijali koji na makro razini nemaju katalitička svojstva kada ih se dovede na nanoskalu pokazuju katalitičku aktivnost^[1].

Navedeno svojstvo nanočestica pokazalo se korisnim u komercijalizaciji gorivnih članaka gdje se zahtjeva da katalitički materijal bude jeftin, učinkovit i da je prisutan u velikoj količini što nanočestice zadovoljavaju.

2.6.3 Elektronika

Minijaturizacijom elektroničkih komponenti započinje nova era u području elektrotehnike i računarstva. Slaganjem elektroničkih komponenti na površinu veličine čipa otvaraju se nove mogućnosti i poboljšana svojstva^[5]:

- visoka učinkovitost
- male komponente-manji troškovi izrade
- veća električna provodnost

- veći kapacitet pohrane energije
- veća gustoća energije i trajnost baterija
- smanjenje mase i debljine zaslona
- poboljšanje kvalitete slike na zaslonu
- smanjenje potrošnje energije
- povećanje brzine rada računala

Primjena nanočestica u elektronici kao i u ostalim područjima dovela je do revolucionarnog napretka, no njihov utjecaj na ljudsko zdravlje i okoliš još nije u potpunosti istražen. Iz tog razloga, budući ciljevi trebaju biti usmjereni na iskorištavanje prednosti koje nudi nanotehnologija uz minimaliziranje i kontrolu rizika.

3. NANOČESTICE SREBRA

Posljednjih nekoliko desetljeća, rast stanovništva, industrije i urbanizacije doveo je do pojave novih bolesti povezanih s onečišćenim zrakom, vodom i tlom. Iz tog razloga novi načini rješavanja tih problema konstantno se istražuju. Srebrne nanočestice posjeduju jedinstvena svojstva koja ih čine prikladnima za navedenu svrhu zbog čega se sve češće koriste u svakodnevnim proizvodima. Sve veća uporaba srebrnih nanočestica donosi i nove rizike stoga je nužno razumijevanje njihovog utjecaja na ljudsko zdravlje i okoliš.

3.1 Sinteza nanočestica srebra

3.1.1 Kemijska sinteza

Postoje različite metode sinteze srebrnih nanočestica: fizikalne, kemijske i biološke metode. Svaka od metoda pokazuje određene prednosti i mane, ipak najčešće korištena metoda je kemijska sinteza koja je ujedno i najjednostavniji način pripreme srebrnih nanočestica u vodenoj otopini.

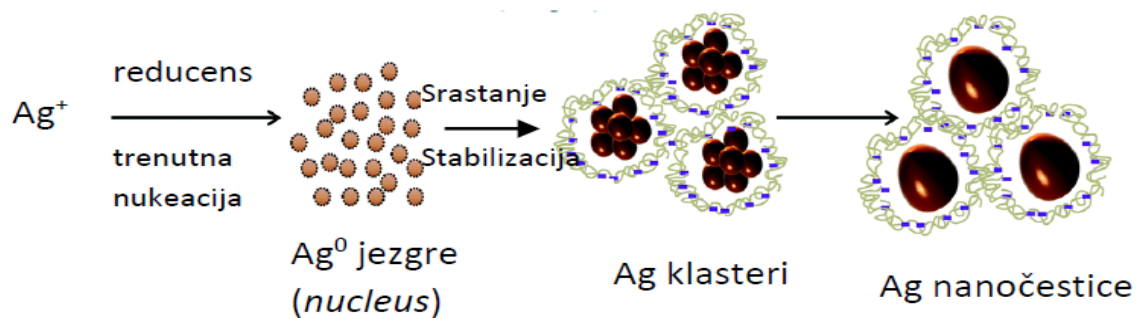
Kemijski proces sinteze zahtjeva tri osnovne komponente^[7]:

1. Metalni prekursor
2. Reducirajući agens
3. Stabilizirajući agens

Za pripremu srebrnih nanočestica prije svega je potreban metalni prekursor. U tu svrhu najčešće se koristi sol srebra, AgNO_3 . Sinteza započinje redukcijom soli pri čemu se koristi neki od reducirajućih agensa (NaBH_4 , glukoza, etilen-glikol, natrijev citrat, Tollens reagens, elementarni vodik) pomoću kojih ionsko srebro (Ag^+) prelazi u elementarno srebro (Ag^0)^[7]:



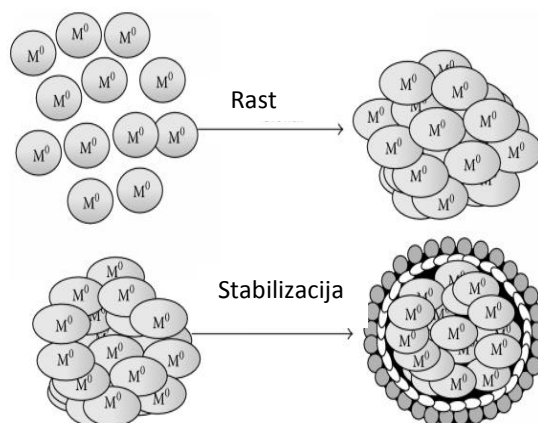
Općenito, sam proces formiranja srebrnih nanočestica uključuje dva procesa: nukleaciju i rast. Nukleacija predstavlja proces formiranja malih čestica (1-2 nm ili manje) koje čine jezgru tzv. *nucleus* za daljnji rast kristala koji je termodinamički potican proces zbog smanjenja specifične površinske energije tijekom rasta kristala^[8]. Slijedi formiranje klastera koji će konačno dovesti do nanočestica (slika 7.).



Slika 7: Shematski prikaz sinteze srebrnih nanočestica

Koraci nukleacije i rasta utječu na oblik i veličinu sintetiziranih nanočestica, monodisperznost i uniformnost veličine čestica. Nukleacija i rast mogu se kontrolirati podešavanjem reakcijskih parametara kao što su: pH, temperatura, prekursor, reduksijski agensi i stabilizirajući agensi^[9].

Vrlo važna komponenta sinteze je uporaba zaštitnih agensa (stabilizatora) kojima se štite i stabiliziraju raspršene nanočestice. Stabilizatori imaju funkciju kontrole veličine nanočestica i sprječavaju pojavu agregacije^[3]. Naime, agregacija je neželjena pojava jer je poželjno da čestice zadrže nano veličinu u kojoj su najaktivnije. Stabilizatori adsorbiraju na površinu nanočestice pri čemu pružaju elektrostatičku stabilizaciju (npr. trinatrijev citrat, Na₃C₆H₅O₇) ili steričku stabilizaciju (npr. poli(vinilpirolidon), PVP). Na slici 8. prikazano je kako izgleda stabilizirana nanočestica. Izgledom podsjeća na kapsulu koju čini stabilizator unutar kojeg su smješteni atomi metala. Tako zaštićena nanočestica minimalizira mogućnost ponovne pretvorbe metalnog oblika Ag⁰ u ionski oblik Ag⁺ koji je toksičan, no u određenim situacijama dolazi do otpuštanja Ag⁺ iona na čemu se temelji njegova primjena. U svrhu stabilizacije nanočestica i smanjenja toksičnosti uspješnima su se pokazale huminske kiseline o čemu će kasnije biti govora.



Slika 8: Rast i stabilizacija metalne nanočestice

3.1.2 Fizikalna sinteza

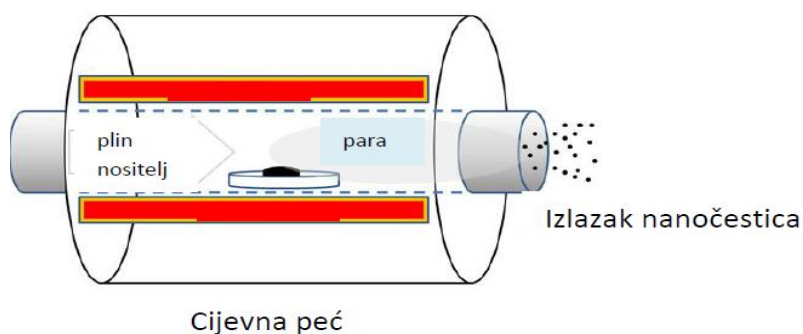
Najvažniji fizikalni načini sinteze srebrnih nanočestica su:

1. isparavanje–kondenzacija,
2. laserska obrada materijala.

Isparavanje–kondenzacija

Postupak se temelji na prevođenju materijala u plin nakon čega slijedi hlađenje plina pri čemu se formiraju nanočestice srebra.

Isparavanje materijala može se provoditi u peći u obliku cijevi pri atmosferskom tlaku (slika 9.) pri čemu se materijal smješta unutar peći uz prisutnost inertnog plina (obično N_2 ili He) i zagrijava na željenu temperaturu. Oblik, veličina i raspodjela dobivenih nanočestica kontrolirana je brzinom isparavanja (brzina zagrijavanja), brzinom kondenzacije (brzina hlađenja) i protokom plina^[3].



Slika 9: Shematski prikaz postupka sinteze nanočestica pomoću cijevne peći

Kod takvog procesa postoje neki nedostaci koji ograničavaju uporabu ovog tipa sinteze:

- peć zauzima puno prostora
- velika potrošnja energije za postizanje željene temperature
- dugo vrijeme postizanja termičke stabilnosti
- zahtjev za snagom većom od nekoliko kW
- zahtjev za predgrijavanjem od nekoliko desetaka minuta za postizanje stabilne radne temperature

Druga mogućnost isparavanja materijala je korištenjem malih keramičkih grijača koji imaju lokalizirana područja grijanja^[10]. Grijač može doseći temperaturu od 1500 °C za 10 sekundi što ga čini prikladnijim za provođenje materijala u plinovito stanje za razliku od zagrijavanja u peći. Uporabom ove metode sinteza nanočestica je stabilna jer se temperatura grijača ne mijenja u vremenu. Budući da grijači nisu raspoređeni po cijeloj površini, već na lokaliziranim područjima, između grijača i područja oko grijača prisutan je veliki temperaturni gradijent koji omogućava brzo hlađenje isparenog materijala. Iz tog razloga, ovom metodom moguće je dobiti male nanočestice u visokoj koncentraciji što je prednost ovog puta sinteze.

Laserska obrada materijala

Laserskom obradom srebrnih makromaterijala manji dio materijala isparava za razliku od isparavanja čitavog uzorka fizikalnim metodama. To se postiže tako da je visoka energija lasera usmjerena na lokalizirano područje materijala koje se brzo zagrijava i isparava (slika 10)^[11]. Na taj način dobiva se manja količina nanočestica, ali je metoda prikladna za dobivanje nanočestica iz makromaterijala koji imaju nepraktičnu temperaturu isparavanja.

Svojstva proizvedenih nanočestica ovisit će o:

- valnoj duljini laserskog zračenja
- duljini laserskog pulsiranja
- duljini obrade materijala
- mediju
- prisutnosti surfaktanta

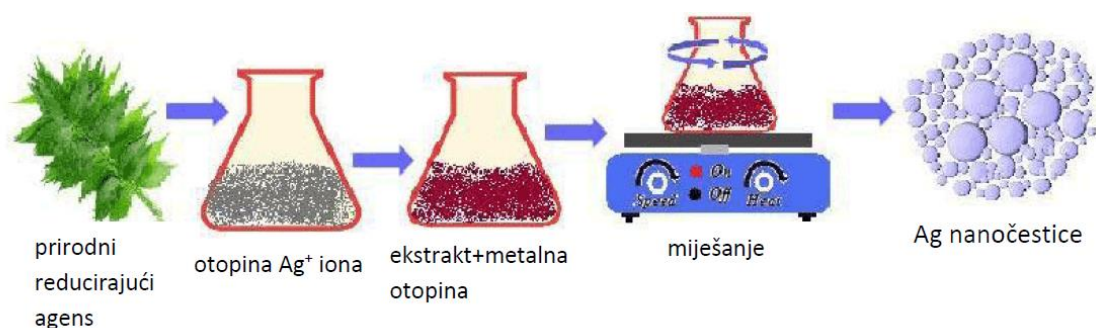
Medij u kojem se odvija ablacija te prisutnost surfaktanta su važni čimbenici koji će utjecati na svojstva sintetiziranih nanočestica. Naime, medij utječe na proces hlađenja, na procese oksidacije i redukcije, a surfaktanti omogućavaju stabilnost nanočestica te ograničavaju njihovu veličinu.



Slika 10.: Laserska ablacija makromaterijala

3.1.3 Biološka sinteza

Kao što je prethodno navedeno, za kemijsku sintezu potrebne su tri komponente: metalni prekursor, reducirajuće sredstvo i stabilizator. U biološkoj sintezi reducirajuće sredstvo i stabilizator zamijenjeni su molekulama koje proizvode živi organizimi. Bio redukcija metalnih iona ostvaruje se biomolekulama pronađenima u ekstraktima različitih organizama-bakterije, fungi, kvasac, alge i biljke^[3].



Slika 11: Biosinteza nanočestica

U biološkoj sintezi nanočestica stanična membrana mikroorganizama ima ključnu ulogu. Negativno nabijena stanična membrana elektrostatički međudjeluje s pozitivno nabijenim srebrnim ionima i reducira ih u nanočestice.

Ova metoda sinteze nije štetna za okoliš stoga se često naziva i "zelena sinteza". Iako biosinteza ima prednosti naspram konvencionalnih puteva sinteze nanočestica i redukcija se ostvaruje puno brže, količina nanočestica dobivenih ovom metodom je vrlo ograničena zbog čega je još uvijek češća uporaba kemijskih puteva sinteze.

3.2 Svojstva nanočestica srebra

Nanočestice srebra posjeduju specifična fizikalna, kemijska i biološka svojstva kojima prednjače naspam makro srebra.

Imaju sljedeća fizikalno-kemijska svojstva^[3]:

- visoka električna i termička vodljivost
- površina podložna Ramanovom raspršenju
- kemijska stabilnost
- katalitička aktivnost
- specifična optička svojstva - površinska plazmonska rezonancija (SPR, od engl. *Surface Plasmon Resonance*)

Zasigurno najzanimljivije svojstvo srebrnih nanočestica je njihova antimikrobiološka aktivnost što je i jedan od motiva za ovaj rad stoga će ostatak ovog poglavlja biti posvećen upravo tome.

3.2.1 Antimikrobiološko djelovanje nanočestica srebra

U borbi protiv štetnih bakterija i bolesti koje uzrokuju, antibiotici su se do sada pokazali učinkovitima, ali razvoj bakterija i rast otpornosti prema tim antibioticima raste toliko brzo da se nova sredstva antimikrobiološkog djelovanja konstantno istražuju. Srebro već stoljećima pokazuje jedinstvena svojstva visoke antimikrobiološke aktivnosti, a važna činjenica je da bakterije još nisu pronašle način kako se oduprijeti njihovom djelovanju.

3.2.2 Mehanizam antimikrobiološkog djelovanja

Za razliku od srebra u makro formi koji je nereaktivan, srebrne nanočestice pokazale su se aktivnima i visokotoksičnima za čak 16 vrsta bakterija ^[12]. Navedeno svojstvo pripisuje se vrlo maloj veličini srebrnih nanočestica te je uočeno da što je njihova veličina manja, baktericidno djelovanje je veće. Mikrobi su izloženi vrlo velikoj i reaktivnoj specifičnoj površini nanočestica koja omogućava njihovo direktno međudjelovanje.

Točan mehanizam djelovanja nanočestica na bakterije nije u potpunosti razjašnjen, no pretpostavljeni koraci antimikrobiološkog djelovanja su:

1. Nanočestice, pretežno veličine 1-10 nm, vežu se na površinu stanične membrane bakterije ometajući njene osnovne funkcije-disanje i propusnost
2. Disocijacija srebrnih nanočestica i otpuštanje Ag^+ iona
3. Uništavanje stanične membrane bakterije i ulazak Ag^+ iona u unutrašnjost stanice uzrokujući daljnja oštećenja i spriječavanje vitalnih funkcija bakterije

Kako bi srebro imalo antimikrobiološka svojstva mora biti u ionskom obliku, Ag^+ . Naime, neionizirano srebro je inertno, ali u vodenim otopinama srebrne nanočestice opuštaju aktivne srebrne ione. Nedavna istraživanja^[13] pokazala su da otopina nanočestica srebra koncentracije 200 ppm nema toksično djelovanje na bakterije. U slučaju ionskog srebra, koncentracija od samo 15 ppb pokazala se smrtonosnom za bakterije. Nanočestice srebra prevelike su da bi ušle u stanicu bakterije što je još jedna činjenica koja ide u prilog da je Ag^+ oblik odgovoran za razaranje bakterija. Srebrni ioni vežu se za staničnu membranu bakterije, razaraju membranu pri čemu dolazi do propuštanja staničnog sadržaja. Ioni ulaze u unutrašnjost bakterije pri čemu stupaju u interakciju s DNA i proteinima te spriječavaju osnovne funkcije bakterije.

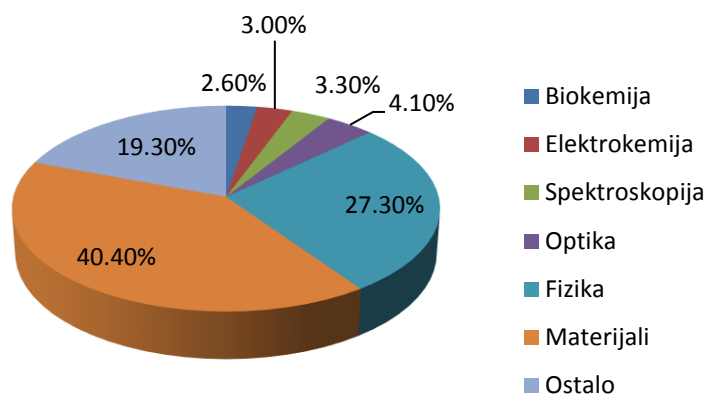
Antimikrobiološki učinci Ag^+ ^[14]:

- povećanje permeabilnosti stanične membrane bakterije
- uništavanje slojeva peptidoglikana na staničnoj membrani
- utjecaj na ribosome (vezanje na ribosomsku podjedinicu) i inhibicija sinteze proteina
- interakcija s DNA (sumporne i fosforne komponente) i inhibicija replikacije

- vezanje na tiolne skupina (-SH) enzima odgovornih za katalizu oksidacijsko-redukcijskih procesa, osobito onih u koje je uključen molekulski kisik (utjecaj na stanično disanje) → smrt stanice (apoptoza)
- antimikrobiološki učinci ovise o obliku nanočestice - rast aktivnosti u sljedećem nizu: prutićasti, sferičan i trokutasti oblik

3.3 Primjena srebrnih nanočestica

Nanosrebro ima najviši stupanj komercijalizacije među svim nanomaterijalima, a njegova primjena najvećim dijelom temelji se na dezinfekcijskim svojstvima. Na slici 12 prikazana su područja istraživanja nanosrebra na kojima se temelji njegova primjena.



Slika 12: Područja istraživanja nanosrebra

3.3.1 Primjeri primjene srebrnih nanočestica

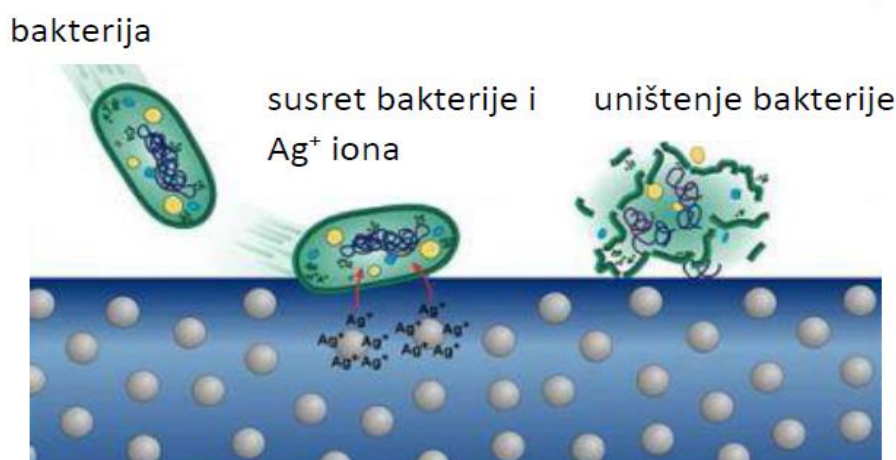
Dezinfekcija zraka

Bioaerosoli su čestice u zraku biološkog porijekla koje mogu izazivati alergijske reakcije te imati infektivna i toksična svojstva. Njihova akumulacija u velikim količinama je uočena u interijerima i to na mjestima sustava ventilacije i klimatizacije^[3]. Vanjsko onečišćenje zraka uzrok je taloženja organskih i anorganskih materijala na filterima ventilacije zraka u interijeru koji su pogodan medij za mikrobiološki razvoj. Kako bi se

reducirao mikrobiološki razvoj na filterima zraka, razvijeni su filteri s nanosrebrom. Depozicija srebra ne utječe na fizikalna svojstva filtera kao što su pad tlaka i učinkovitost filtracije, ali pokazuje znatan utjecaj na smanjenje učinkovitosti adsorpcije, a time i na smanjenje mikrobiološkog razvoja.

Dezinfekcija pitke vode

Kao učinkovito dezinfekcijsko sredstvo za onečišćenu vodu pokazalo se nanosrebro koje se u ovom slučaju proizvodi kemijskim putem i jednoliko nanosi na porozni keramički materijal s vezujućom molekulom 3-aminopropiltrietoksisilan (APTES) čineći kompozit^[3]. Taj kompozit može biti pohranjen dulje vrijeme i otporan je na višestruka ispiranja bez gubitaka nanočestica. Između srebrnih nanočestica i keramičke baze ostvaruju se veze između amino skupine ($-NH_2$) APTES molekula i srebrnih atoma s površine nanočestica koje omogućuju čvrsto vezanje srebrnih nanočestica na unutarnje kanale porozne keramičke baze otkuda se polako otpuštaju Ag^+ ioni koji dezinficiraju vodu onečišćenu bakterijama i virusima.



Slika 13: Pojednostavljeni prikaz djelovanja nanočestica srebra na mikroorganizme

Boje s dezinfekcijskim učinkom

Boje s ugrađenim srebrnim nanočesticama često se koriste na javnim područjima kao što su rukohvati u autobusima, na željeznicama ili u trgovačkim centrima gdje je potrebno dezinfekcijsko djelovanje. Prirodni proces oksidacije boje prilikom sušenja koristi se kao osnova za redukciju metalnih soli i raspršenje metalnih nanočestica u ulju boje. Na taj način izbjegnuta je uporaba vanjskog reducirajućeg ili stabilizirajućeg agensa. Raspršenje srebrnih

nanočestica u boji može se koristiti na različitim površinama kao što su drvo, staklo, čelik i različiti polimeri.

Pohrana prehrambenih namirnica

Srebrne nanočestice pokazale su se korisnima u svrhu pohrane hrane tijekom duljeg vremena u ambalažama u kojima stvaraju atmosferu koja ne pogoduje antimikrobiološkom razvoju te produljuje svježinu namirnica.

Postoji nekoliko prednosti u korištenju nanosrebra u prehrambenoj ambalaži^[3]:

- velika specifična površina-veće antimikrobiološko djelovanje
- reducirana količina materijala potrebna za učinkovito čuvanje hrane
- povećanje vlačne čvrstoće do 40 % - smanjenje količine materijala u proizvodnji vrećica
- povećanje termičke stabilnosti
- povećanje zaštitnih svojstva prema permeaciji plinova kao što su O₂, CO₂, vlaga, hlapljive komponente te UV-zračenja
- redukcija promjene hrane tijekom vremena stvarajući tzv. "vijugav put" koji otežava prolazak plinovima i vlazi

Medicinska uporaba

Srebrne nanočestice najčešće su korišteni nanomaterijali u području zdravstvene zaštite već stotinama godina. Područja njihove uporabe u medicinske svrhe se sljedeća:

- **Zavoji za rane:** povećano antimikrobiološko djelovanje i brže zacijeljivanje rana u odnosu na klasične zavoje
- **Medicinski tekstil** (odjeća medicinskih radnika): znatno smanjenje količine bakterija u usporedbi s običnom pamučnom/poliesterskom tkaninom
- **Kardiovaskularni implantati:** povećano antimikrobiološko i antitrombocitno djelovanje-ugradnja nanočestica u prevlake srčanih zalistaka i stentova
- **Materijal za popunjavanje šupljina i fiksaciju kosti:** dodatak od samo 1 % nanosrebra koštanom materijalu drastično povećava antimikrobiološka svojstva i otpornost prema trošenju

- **Dentalni materijal:** ugradnja nanočestica u zubna ljepila, šavove, implantate i druge zubne umetke pokazuje značajna antibaktericidna svojstva prema bakterijama odgovornim za najčešće probleme usne šupljine
- **Biodijagnoza:** nanočestice kao biomarkeri za stanice raka- selektivno uništavanje ciljanih stanica raka pomoću fototermičke terapije

3.4 Toksična svojstva srebrnih nanočestica

Iznimna svojstva proizvoda na bazi nanosrebra čija proizvodnja je u konstantnom porastu zasjenjuju potencijalne dugoročne opasnosti na ljudsko zdravlje i okoliš. Do sada, toksičnost i sudbina nanočestica otpuštenih u okoliš nije dovoljno istražena i nema zakona koji ih reguliraju, no činjenica je da povećana uporaba tih proizvoda rezultira većom koncentracijom srebrnih nanočestica koje završavaju u okolišu i izazivaju promjene u ekosustavu.

Srebrne nanočestice smatraju se toksičnima za mikroorganizme, no netoksičnima za sisavce. Međutim, nedavna istraživanja otkrila su toksično djelovanje na jetru i živčane stanice štakora te stanice u tkivu pluća čovjeka. Također, izloženost se pokazala smrtonosnom i za neke vodene organizme, a postoji i dokaz da biljke imaju mogućnost koncentriranja materijala nanočestica čime se povećava potencijal za njihovim taloženjem u okolišu.

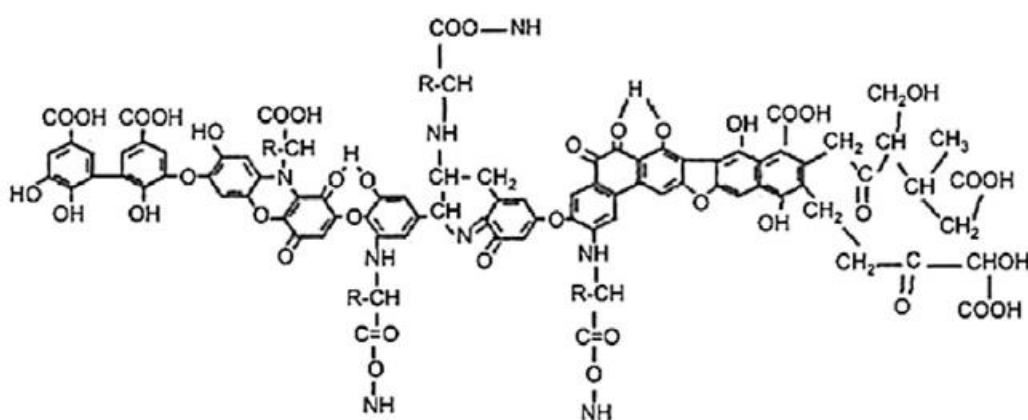
Konačno, motiv ovoga rada bila su saznanja da Ag^+ ioni otpušteni iz srebrnih nanočestica pokazuju manju toksičnost stvaranjem kompleksa s organskim ligandima. U tu svrhu, kao organski materijal korištene su huminske kiseline o kojima će biti riječ u idućem poglavlju.

4. HUMINSKE KISELINE

4.1 Struktura i kemijski sastav

Huminske kiseline (HK) su kompleksne prirodne komponente koje se klasificiraju kao amorfne visokomolekulske organske kiseline. Pronalazimo ih u tlu, sedimentima i vodi te nastaju raspadanjem biljnih i životinjskih ostataka. Huminske kiseline slične su po strukturi koja ovisi o materijalu iz kojeg su izolirane kao i o metodi njihove ekstrakcije^[15].

Zbog kompleksne građe, struktura huminskih kiselina može se samo pretpostaviti. Pretpostavljena strukturna formula huminskih kiselina prikazana je na slici 14.



Slika 14: Pretpostavljena strukturna formula huminskih kiselina (Mirza et al)

Prema kemijskom sastavu huminske kiseline su smjesa slabih alifatskih (ugljični lanci) i aromatskih (ugljični prsteni) kiselina pri čemu oko 35 % strukture čine aromatski prsteni, a ostatak se odnosi na alifatske dijelove^[16]. Sadrže karboksilne, fenolne, kinoidne, hidroksilne, metoksidne, aldehide, ketonske i enolne skupine, a pojavljuju se i atomi sumpora i dušika te mogu uključivati šećere i peptide. Kompleksnu strukturu karakterizira velika molekulska masa koja varira od 10 000 do 100 000. Zbog prisustva različitih funkcionalnih skupina pokazuju amfifilno svojstvo jer su neki dijelovi molekule hidrofilni, a drugi dijelovi lipofilni čime su u mogućnosti vezati komponente koje su inače netopljive u vodi. Predstavljaju polidisperzni sustav zbog različitih kemijskih značajki, a s trodimenzionalnog stajališta smatraju se fleksibilnim linearnim polimerima oblika zavojnice s ukriženim vezama^[17].

Huminske kiseline spadaju u skupinu huminskih tvari koje osim ove kiseline uključuju još i fulvinsku kiselinu i humin. Te tri frakcije huminskih tvari razlikuju se prema topljivosti i

adsorpcijskim svojstvima na temelju kojih je moguća izolacija pojedinih komponenti iz tla. Podjela huminskih tvari sa svojstvima sažeta su u tablici 3.

Tablica 3. Podjela huminskih tvari i svojstva

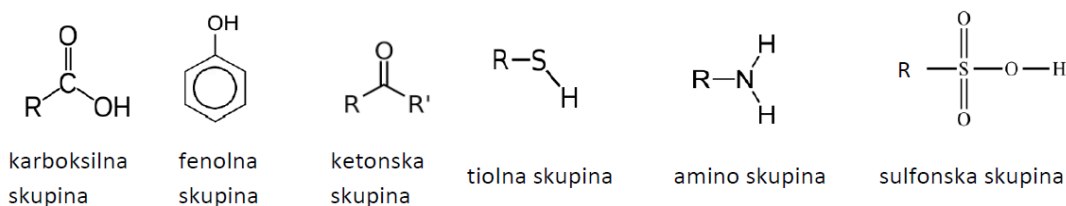
	Huminske kiseline (HK)	Fulvinske kiseline (FK)	Humin
Svojstva	<ul style="list-style-type: none"> • topljive u alkalnim uvjetima • precipitacija pri $\text{pH} < 2$ • visoka molekulska masa 	<ul style="list-style-type: none"> • topljive pri svim pH • niska molekulska masa, manje N, S i H sadržaja u funkcionalnim skupinama od HK • bogatije fenolnim i ketonskim skupinama od HK-veća kiselost od HK 	<ul style="list-style-type: none"> • netopljiv pri svim pH • strukturno sličan HK • teška ekstrakcija zbog čvrstog vezanja

4.2 Modifikacija huminskih kiselina i uporaba

Uporaba huminskih kiselina ovisi o njihovom kemijskom sastavu i svojstvima, a najveći je značaj u vezanju metalnih iona i formiranju kompleksa. Iz tog razloga pokazale su se korisnima u transportu nutrijenata iz tla do biljaka, uklanjanju teških metala iz tla i vode, inhibiciji formiranja slobodnih radikala te redukciji i stabilizaciji metalnih nanočestica. Svojstva ovise o prisutnim funkcionalnim skupinama, a kemijskom modifikacijom huminskih kiselina utječe se na funkcionalni sastav^[15]. Ciljanom modifikacijom može se povećati sadržaj željenih funkcionalnih skupina i na taj način dobiti željeno djelovanje.

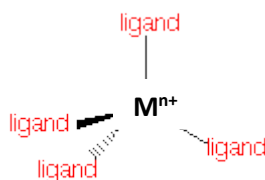
Aktivna mjesta huminskih kiselina za sorpciju^[18]:

- Ionizirajuće organske funkcionalne grupe



- napolarna područja sklona Van der Waalsovima interakcijama
- polarna područja (prisutnost O, S i N atoma polarnog karaktera u strukturi) - zadržavanje metalnih kationa i polarnih komponenti

Huminske kiseline zbog svojih sorpcijskih svojstava su ekološki važne kada je u pitanju kruženje metala u prirodi. Njihova posebnost leži u činjenici da mogu vezati metalne ione, okside i hidrokside čineći stabilne komplekse te ih sporo i kontrolirano otpuštati. Na taj način reduciraju toksičnost i mogućnost akumulacije štetnih tvari u okolišu stoga im se često pripisuje uloga "čistača" tla, a isti efekt imaju i u pročišćavanju voda^[19].



Slika 4: Kompleks metalni ion-ligand (Ag^+ ioni-huminske kiseline)

Priroda stvaranja kompleksa između huminskih kiselina i kationa metala potječe od heterogenog, polielektričnog i polidisperznog karaktera huminskih kiselina koji je javlja zbog prisutnosti velikog broja funkcionalnih grupa^[19]. Kontrola ponašanja metala u okolišu stvarajući komplekse ovisi o različitim parametrima kao što su: karakteristike huminskih kiselina (funkcionalne skupine), materijal iz kojih su izolirane huminske kiseline, koncentracija metalnih iona te pH.

Konačno, razlozi korištenja huminske kiseline kao sorbensa mogu se sažeti u nekoliko točaka:

- prirodni kelator za metalne ione (nije štetan za okoliš)

- visok kapacitet ionske izmjene
- redukcija toksičnosti
- visok kapacitet sorpcije
- niska cijena, visoka učinkovitost

4.3 Kompozit srebrne nanočestice/huminske kiseline (AgNČ/HK)

Kao što je spomenuto u Poglavlju 3., srebrne nanočestice zbog sve veće uporabe u komercijalnim proizvodima imaju i veću mogućnost akumulirati se u okolišu i izazvati neželjene posljedice. Iz tog razloga, značajan napor uložen je kako bi se istražili materijali i okolišni parametri koji mogu kontrolirati njihovo ponašanje i utjecaj na okoliš.

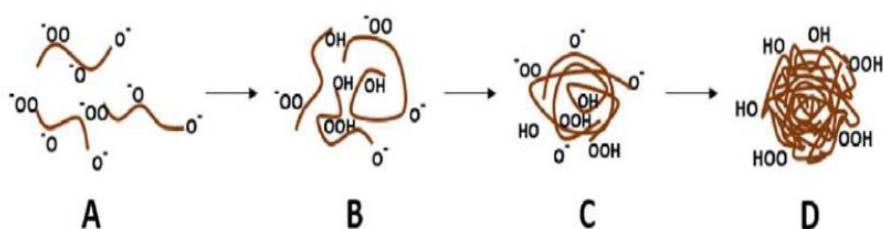
Postojeće analitičke tehnike nisu specifične za metalne ione u svrhu utjecaja na njihovu bioraspoloživost, stabilnost i akumulaciju u okolišu. Iz tog razloga, pribjegava se nekonvencionalnim metodama kao što je stvaranje kompleksa s organskim tvarima koje imaju mogućnost kontrole za okoliš problematičnih komponenti.

Kada srebrne nanočestice uđu u okoliš, susreću se s nizom varijacija u temperaturi, pH, izloženosti svjetlosti, ionskoj jakosti, koncentraciji kisika i organske tvari. Svi ti parametri utječu na stabilnost nanočestica i imaju potencijal za izazivanjem disocijacije srebra u ionski oblik, Ag^+ koji je dokazano toksičan. Dakle, potreban je agens koji bi kontrolirao njihovo ponašanje. Potencijalno rješenje su huminske kiseline koje su bogate aktivnim mjestima koja imaju visok afinitet za vezanjem metalnih iona kao što su Ag^+ ioni.

Kao što je poznato, srebro pokazuje antimikrobiološko djelovanje zahvaljujući kontroliranom otpuštanju Ag^+ iona koji penetriraju u stanicu bakterije. Kako bi korisno djelovanje srebra bilo izraženo, potrebna je njegova kemijska stabilnost i mogućnost kontrole otpuštanja iona. Zbog svojih svojstava, huminske kiseline pokazuju stabilizirajuće djelovanje za nanočestice srebra i održavaju ih u njihovom stabilnom obliku. Naime, huminske kiseline utječu na steričko odbijanje između nanočestica i time smanjuju mogućnost agregacije.

Interakcija molekula huminskih kiselina i metalnih iona je prvenstveno elektrostatička. Kationi se kreću do termodinamički preferiranih područja na huminskoj kiselini što rezultira stvaranjem nanokompozita srebro/huminske kiseline. Iako proces nije u potpunosti jasan, nekim istraživanjima pokazano je da što je veći sadržaj fenolnih i karboksilnih skupina u strukturi huminskih kiselina, to je vezanje metala učinkovitije^[19].

Huminske kiseline topljive su u neutralnom do alkalnom mediju. U alkalnom mediju karboksilne i fenolne skupine su deprotonirane što rezultira odbijanjem negativno nabijenih grupa i istežanjem strukture huminske kiseline (slika 16A). Smanjenjem pH vrijednosti funkcionalne grupe su protonirane i efekt odbijanja se smanjuje uzrokujući stvaranje kompaktne strukture molekule (slika 16D). U takvoj formi hidrofobni dijelovi nalaze se u unutrašnjosti strukture, a hidrofilni dijelovi su s vanjske strane u kontaktu s medijem i formiraju strukturu pseudo-micela^[19].



Slika 5: Ponašanje huminske kiseline u različitim pH uvjetima: (A) alkalni pH: odbijanje; (B) redukcija pH: unutarmolekularna agregacija; (C) redukcija pH: međumolekularna agregacija; D: kiseli pH: forma pseudomicela

Smještanjem iona u unutrašnje dijelove pseudomicela, Ag^+ ioni izoliraju se od okoline, a zbog prisutnosti funkcionalnih skupina sklonih ionskoj izmjeni pretpostavlja se da dolazi do ionske izmjene srebrnih iona s H^+ ionima karboksilnih ili fenolnih skupina. Također, huminska kiselina djeluje kao reducirajuće sredstvo pri čemu Ag^+ oblik prelazi u stabilan Ag^0 oblik što se može potvrditi instrumentalnim metodama.

Konačno, treba napomenuti da zbog vrlo kompleksne prirode huminskih kiselina, sinteze nanočestica i antimikrobiološkog djelovanja, proces formiranja nanokompozita huminske kiseline/srebrne nanočestice može se opisati samo hipotetski. Međutim, instrumentalnim metodama može se dokazati smanjenje koncentracije Ag^+ iona u inicijalnoj otopini, formiranje nanočestica koje adsorbiraju/precipitiraju na huminske kiseline te njihovo antimikrobiološko djelovanje što će detaljnije biti objašnjeno u nastavku rada.

5. MATERIJALI I METODE

5.1 Adsorbens

- Natrijev humat, tech., 80 % (Sigma-Aldrich, Njemačka)

5.2 Kemikalije

- AgNO₃, p.a.(Poch, Poljska)
- HNO₃, konc.(Sigma-Aldrich, Njemačka)
- NaOH (s), w>97 % (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Mueller-Hinton agar (Sigma-Aldrich, Njemačka)

Sve korištene kemikalije su analitičke čistoće. Otopine su pripremane otapanjem krutina ili razrjeđivanjem koncentriranih otopina u deioniziranoj vodi.

5.3 Instrumentacija

- Vaga – AV313 Adventurer Pro, OHAUS
- Magnetska miješalica – CIMAREC i Poly 15, Thermo Fisher Scientific
- pH metar – SevenCompact, Mettler Toledo
- Centrifuga - 5810 R, Eppendorf
- Atomijski apsorpcijski spektrometar - AAnalyst 800, Perkin Elmer
- SEM-EDX mikroskop - FEITecnai F20 X-Twintool; bakrena podloga za uzorak obložena ugljikom - Lacey Carbon Support Film 400 mreža
- FTIR spektrofotometar - FTIR ATR, Vertex 70, Bruker Optik s detektorom DLaTGS
- XRD difraktometar - X'Pert Pro
- Termogravimetar - SDT 2960 TGA-DTA, Thermal Analysis Instruments
- Elementarni analizator - Vario Macro CHN, Elementar Analysen systeme GmbH

Sva mjerenja provedena su pri sobnoj temperaturi u rasponu od 20 do 25 °C.

5.4 Modifikacija huminskih kiselina

Modifikacija se provodi prema metodi Sekija i Suzukija^[20] koja se sastoji od žarenja u peći pri 300 °C u vremenu od 3 sata. Huminska kiselina prelazi u netopljiv oblik i dolazi do promjene funkcionalnog sastava. U netopljivom obliku omogućeno je lakše uklanjanje huminske kiseline sa srebrom iz otopine nakon sinteze nanokompozita.

5.5 Niz eksperimenata

Niz eksperimenata proveden je s ciljem utvrđivanja optimalnih uvjeta za sintezu nanokompozita srebrne nanočestice/huminske kiseline. U tu svrhu mijenjani su sljedeći parametri: vrijeme kontakta Ag^+ iona i huminske kiseline, početna pH vrijednosti, kao i početne koncentracije Ag^+ iona.

Priprema otopine Ag^+ iona

Temeljna standardna otopina 1 g/L otopine Ag^+ iona pripremljena je otapanjem 1,5742 g AgNO_3 soli u 1 L deionizirane vode.

Otopine Ag^+ iona manjih koncentracija pripremljene su razrjeđenjem temeljne standardne otopine dodatkom deionizirane vode.

5.5.1 Utjecaj vremena kontakta (kinetika)

Korišteno je 11 uzoraka sa sljedećim vremenima kontakta huminske kiseline i otopine Ag^+ iona: 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 80, 100 i 120 minuta. Prije početka sinteze, pH vrijednost radne otopine Ag^+ iona namještena je na vrijednost 6 dodatkom 1 % otopine HNO_3 .

Svaki uzorak sačinjavalo je 50 mL otopine Ag^+ iona, koncentracije 30 mg/L, pomiješanih s 30 mg modificirane huminske kiseline. Uzorci su se stavljali na magnetsku miješalicu uz različita vremena kontakta. Nakon isteklog vremena kontakta, uzorci su dekantirani u kivete i centrifugirani (5 minuta, 10000 okr/min, 25 °C) kako bi se eliminirala agregacija čestica i osiguralo uklanjanje sitno dispergirane huminske kiseline sa srebrom od otopine rezidualnih srebrnih iona. Od centrifugirane otopine s površine se uzimalo 10 mL uzorka na kojem se provodila analiza atomskom apsorpcijskom spektrometrijom.

5.5.2 Primijenjeni kinetički modeli

Za istraživanje mehanizma adsorpcije/precipitacije srebra na huminsku kiselinu korišteni su različiti kinetički modeli kojima su se pokušali opisati eksperimentalni rezultati: nultog reda, prvog reda, pseudo prvog reda i pseudo drugog reda.

Model nultog reda

Model nultog reda opisuje se jednadžbom:

$$C = C_0 - k_0 t \quad (2)$$

gdje je C (mg L^{-1}) koncentracija iona srebra u otopini u vremenu t (min), C_0 (mg L^{-1}) je početna koncentracija iona srebra, a k_0 konstanta brzine reakcije ($\text{mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Reakcija nultog reda ima brzinu koja je neovisna o koncentraciji reaktanata. Povećanjem koncentracije reagirajućih komponenti, neće se povećati brzina reakcije, odnosno, količina reaktanta je proporcionalna vremenu. Ovaj model korišten je za opisivanje lineranih dijelova izdvojenih s kinetičke krivulje.

Model prvog reda

Kinetički model prvog reda određen je sljedećim izrazom:

$$C = C_0 \exp(-K_1 t) \text{ ili } \ln(C/C_0) = -K_1 t \quad (3)$$

gdje je C (mg L^{-1}) koncentracija iona srebra u otopini u vremenu t (min), C_0 (mg L^{-1}) je početna koncentracija iona srebra, k_1 (min^{-1}) je konstanta brzine reakcije.

U reakcijama prvog reda brzina reakcije je proporcionalna koncentraciji reaktanata što znači da povećanjem koncentracije reagirajućih komponenti, povećat će se i brzina reakcije.

Model pseudo prvog reda

Ukoliko je koncentracija jednog od reaktanata znatno manja od koncentracije drugog reaktanta u obzir se uzima samo reaktant veće koncentracije. Takva reakcija naziva se reakcija pseudo prvog reda jer je teoretski riječ o reakciji reda većeg od 1.

Reakcija pseudo prvog reda opisuje se Lagergrenovom jednažbom:

$$q_t = q_e (1 - \exp(-k_{p1} t)) \quad (4)$$

gdje je q_e (mg/g) količina srebra adsorbiranog/precipitiranog u ravnoteži, q_t (mg/g) je količina srebra adsorbiranog/precipitiranog u vremenu t (min), k_{p1} je konstanta brzine reakcije pseudo prvog reda (min^{-1}).

Model pseudo drugog reda

Hoova jednažba kinetike reakcije drugog reda predstavlja kinetički model reakcije pseudo drugog reda. Slaganje eksperimentalnih rezultata s rezultatima ovog modela ukazuje na prisutnost procesa kemijskog vezanja metala iz otopine na adsorbent.

Hoova jednažba:
$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{(k_{p2} q_e^2)} + \frac{1}{q_e} t \quad (5)$$

gdje je q_e (mg/g) količina srebra adsorbiranog/precipitiranog u ravnoteži, q_t (mg/g) je količina srebra adsorbiranog/precipitiranog u vremenu t (min), k_{p2} je konstanta brzine reakcije pseudo drugog reda (g/mg min).

5.5.3 Utjecaj pH

Korišteno je 6 različitih pH vrijednosti otopine Ag^+ iona prije dodatka huminske kiseline: 2, 3, 4, 5, 6, 7. Podešavanje pH vrijednosti vršeno je dodatkom 0,5 % otopine HNO_3 i 0,5 % otopine NaOH .

30 mg/L otopine Ag^+ iona zadane pH vrijednosti pomiješano je s 30 mg modificirane huminske kiseline te stavljeno na magnetsku mješalicu u vremenu od 60 minuta. Nakon toga, uzorci su dekantirani u kivete i centrifugirani 5 minuta pri 10000 okr/min. Od centrifugirane otopine s površine se uzima 10 mL i provodi mjerenje rezidualnog srebra u otopini na atomskom apsorpcijskom spektrometru.

5.5.4 Utjecaj početne koncentracije Ag^+ iona

Utjecaj početne koncentracije Ag^+ iona na sintezu nanokompozita određen je koristeći 12 uzoraka sljedećih koncentracija: 2, 5, 10, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 700, 1000 mg/L. Početna pH vrijednost otopina, $\text{pH} = 6$ namještena je dodatkom 1 % otopine HNO_3 i 1 % otopine NaOH .

Različite početne koncentracije otopina Ag^+ iona pripremljene su razrijeđivanjem temeljne standardne otopine, $c(\text{Ag}^+) = 1 \text{ g/L}$ u odmjerne tikvici od 100 mL dodatkom deionizirane vode.

Ostatak postupka isti je kao i u prethodna dva eksperimenta.

5.6 Analiza uklanjanja metala

5.6.1 Plamena atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS)

Atomska apsorpcijska spektrometrija najčešća je metoda za praćenje koncentracije metala u otopinama. Spektrometar se sastoji od šuplje katodne lampe podešene na valnu duljinu elementa koji se određuje i koristi se kao izvor zraka svjetlosti. Analiza se temelji na svojstvu svakog elementa da apsorbira zračenje specifične valne duljine. Tekući uzorak direktno se injektira u instrument gdje se u raspršivaču prevodi u paru. Plamenom se dovodi energija atomima u osnovnom stanju pri čemu prelaze u pobuđeno stanje. Usmjeravanjem zračenja lampe na plamen u kojem se nalaze atomizirane čestice dolazi do apsorpcije zračenja koja je proporcionalna koncentraciji elementa u analiziranom uzroku^[21]. Detektor mjeri količinu zračenja koju je uzorak u plamenu apsorbirao i na temelju toga daje informaciju o koncentraciji elementa.

U ovom radu navedena metoda korištena je kako bi se odredila rezidualna koncentracija srebra u vodenoj otopini nakon sinteze nanokompozita. Valna duljina Ag lampe iznosi 328.1 nm što je valna duljina koju apsorbira srebro. Smanjenje koncentracije Ag^+ iona iz otopine u kojoj se provodi sinteza, potvrda je da je došlo do njegovog uklanjanja u prisutnosti huminske kiseline.

Količina Ag^+ iona uklonjenih iz vodene otopine određena je sljedećim izrazom :

$$q_t = (c_0 - c) \cdot \frac{V}{m} \quad (6)$$

gdje je:

q_t	količina Ag^+ iona adsorbiranih/precipitiranih u vremenu t (mg g^{-1})
m	masa sorbenta (g)
c_0	početna koncentracija Ag^+ iona u vodenoj otopini (mg L^{-1})
c	koncentracija Ag^+ iona u vodenoj otopini u vremenu t (mg L^{-1})
V	volumen otopine (L)

Učinkovitost adsorpcije/precipitacije srebra na huminsku kiselinu u određenom vremenu izračunata je prema sljedećem izrazu:

$$E = \frac{(c_0 - c)}{c_0} \cdot 100 \% \quad (7)$$

gdje je E učinkovitost adsorpcije/precipitacije izražena u postocima.

5.7 Karakterizacija huminske kiseline i nanokompozita AgNČ/MHK

Tablica 4: Metode karakterizacije huminske kiseline i nanokompozita AgNČ/MHK

Metoda	Karakterizacija
Elementarna analiza	Odnos broja pojedinih elemenata u strukturi; C,N,H
Termogravimetrijska analiza (TGA)	Termička stabilnost veza
Infracrvena spektroskopija (FTIR)	Funkcionalne skupine, kemijske veze
Rendgenska difrakcija (XRD)	Kristalografska struktura, kemijski sastav
Mikroskopija (SEM-EDX)	Struktura, morfologija i elementarni sastav

5.7.1 Elementarna analiza (C, N,H)

Elementarna analiza koristi se za dobivanje početne slike huminske kiseline prije i nakon modifikacije. Određivanjem postotnog udjela pojedinog kemijskog elementa može se dobiti odnos pojedinih elemenata u molekuli i pretpostaviti molekulsku formulu. Huminske kiseline su strukturno vrlo kompleksne komponente i njihova molekulsku formulu ne može se točno odrediti, no elementarnom analizom dobiva se informacija o udjelu većinskih elemenata i sadržaju vode.

Određivanje udjela ugljika, dušika i vodika provedeno je elementarnim analizatorom vezanim na plinski kromatograf.

5.7.2 Termogravimetrijska analiza (TGA)

Termogravimetrijska analiza je metoda termalne analize koja upućuje na termičku stabilnost veza u strukturi. Temelji se na mjerenju promjene mase uzorka kao funkcije vremena ili kao funkcije temperature u kontroliranoj atmosferi^[22]. Promjena u masi uzroka upućuje da se dogodio neki proces i da je došlo do promjene u sadržaju analiziranog spoja. Metoda je korištena za utvrđivanje promjene u kemijskom sastavu nakon modifikacije huminske kiseline.

Termičko ponašanje modificirane i nemodificirane huminske kiseline ispitivano je u temperaturnom rasponu 20-1000 °C. Spektar je snimljen usrednjavanjem 64 ciklusa u rasponu valnih brojeva 400-4000 cm⁻¹ s rezolucijom od 4 cm⁻¹.

5.7.3 Infracrvena spektrometrija s Fourierovom transformacijom signala (FTIR)

Infracrvena spektrometrija s Fourierovom transformacijom signala (FTIR) koristi se kao kvalitativni alat za određivanje funkcionalnih skupina i kemijskih veza u ispitivanom uzorku. Infracrveno zračenje prolazi kroz uzorak, dio zračenja uzorak apsorbira, a dio prolazi kroz uzorak (transmisija). Svaka veza u molekuli ima svoju frekvenciju vibracije, a apsorpcijom zračenja iste frekvencije povećava se amplituda te vibracije^[23]. Pomoću Fourierove transformacije rezultati se pretvaraju u svjetlosni izraz koji rezultira infracrvenim spektrom uzorka kao funkcijom valnog broja. Analizirani su sljedeći uzorci: huminska kiselina, modificirana huminska kiselina te sintetizirani nanokompozit AgNČ/MHK (*c* = 50 mg/L i *c* = 200 mg/L). FTIR daje uvid u strukturne promjene huminske kiseline nakon modifikacije te koje funkcionalne grupe sudjeluju u interakciji s nanočesticama srebra.

5.7.4 Skenirajuća elektronska mikroskopija s EDX detektorom

Skenirajući elektronski mikroskop koristi se s ciljem dobivanja detaljnijeg uvida u strukturu površine materijala, a najveća rezolucija može iznositi čak do 5 nm. Princip je da kada usmjereni elektronski snop udara na površinu uzorka, dolazi do izbijanja elektrona uzorka. Pri toj emisiji elektrona, u elektronskom omotaču atoma ostaje prazno mjesto koje se popuni elektronom iz elektronske ljuske više energije. Skokom elektrona s više na nižu energijsku razinu emitira se rendgensko ili X-zračenje koje registrira energo-dispeziivni detektor X-zraka (EDX). Elektronska zraka koja skenira površinu uzorka točno je sinkronizirana s točkom na ekranu računala koju korisnik vidi. Detektor kontrolira svjetlinu točke na ekranu - kada detektor dobije više elektrona koji potječu od određenog svojstva

površine, svjetlina na ekranu se povećava. Kada je manje elektrona, područje na ekranu postaje tamnije^[24].

U svrhu određivanja strukturnih i morfoloških karakteristika ispitivani su sljedeći uzorci: huminska kiselina, modificirana huminska kiselina te sintetizirani nanokompozit AgNČ/MHK ($c = 50 \text{ mg/L}$ i $c = 200 \text{ mg/L}$).

5.7.5 Rendgenska difrakcija (XRD, engl. *X-ray diffraction*)

Rendgenska difrakcija je metoda za određivanje kristalne strukture materijala. Pri ozračivanju materijala rendgenskim zrakama dolazi do difrakcije zraka koja ovisi o veličini i orijentaciji kristala, odnosno rasporedu atoma. Naime, atomi u kristalu raspoređeni su u pravilnom redu te mogu prelamati zračenje i stvarati difrakcijsku sliku. Amorfni materijali nemaju periodičan raspored stoga ne stvaraju difrakcijsku sliku. Određivanje kristalne strukture iz difrakcijske slike vrši se tzv. mapama elektronske gustoće^[25]. Riječ je o prikazu elektronske gustoće u ovisnosti o položaju u prostoru. Difrakcija je uzrokovana elektronskim oblacima što znači da što je veći atomski broj elementa, to je veći elektronski oblak. Osim informacija o stereokemiji, dobiva se uvid i o udaljenosti između atoma te duljini veze.

U ovom radu XRD metoda korištena je kako bi se utvrdila prisutnost nanosrebra na površini huminske kiseline. Ukoliko je srebro u metalnom obliku koje odgovara formi nanočestice doći će do pojave difrakcijske slike. Mjerenje difrakcije rendgenskog zračenja provedeno je difraktometrom s Cu-K α zračenjem ($\lambda=0.1541 \text{ nm}$, 40 kV, 30 mA). Uzorci nanokompozita koncentracije Ag⁺ iona, $c = 50 \text{ mg/L}$ i $c = 200 \text{ mg/L}$ snimani su u rasponu 5-120°2 θ s veličinom koraka od 0,0167 i u rasponu 1-10°2 θ s korakom od 0,0083.

5.8 Analiza antimikrobiološkog djelovanja kompozita AgNČ/MHK

Antimikrobiološka aktivnost sintetiziranog nanokompozita srebrnih nanočestica i huminskih kiselina određena je djelovanjem na sljedeće bakterije:

- gram pozitivne (+) bakterije: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*
- gram negativne (-) bakterije: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*

Za standardizaciju mikrobioloških metoda korišten je McFarlandov standard 0,5 kao referentna vrijednost za podešavanje gustoće bakterijskih suspenzija pri $\lambda = 620$ nm kojem odgovara koncentracija od $150 \cdot 10^6$ bakterija po mililitru (tablica 5.). Ciljana gustoća ostvarena jerazrjeđenjem bakterijske suspenzije medijem Mueller-Hinton uslučaju prevelike mutnosti ili dodatkom bakterija iz inicijalne otopine u slučaju nedovoljne mutnosti.

Tablica 5: McFarland skala mutnosti bakterijskih suspenzija

Standard	Koncentracija / 10^6 bakterija mL^{-1}
0,5	150
1	300
2	600
3	900
4	1200
5	1500

Za utvrđivanje antimikrobiološke učinkovitosti nanokompozita određene su zone inhibicije te minimalna inhibitorna koncentracija (MIC).

5.8.1 Disk-difuzijska metoda

Osjetljivost bakterija na nanokompozit srebra i huminske kiseline analizirana je disk-difuzijskom metodom (engl. *well diffusion method*). 20 mL Mueller-Hinton agar medija presuto je u sterilizirane Petrijeve zdjelice. U središtu agar podloge napravljena su disk udubljenja promjera 5 mm koristeći sterilizirani čep od nehrđajućeg čelika. Na područje uklonjenog agara stavljeno je 50 μL otopine nanokompozita. Zdjelice su inkubirane pri 35 °C na 18 sati. Osjetljivost bakterija određena je mjerenjem promjera čiste zone oko udubljenja.

5.8.2 Metoda minimalne inhibitorne koncentracije

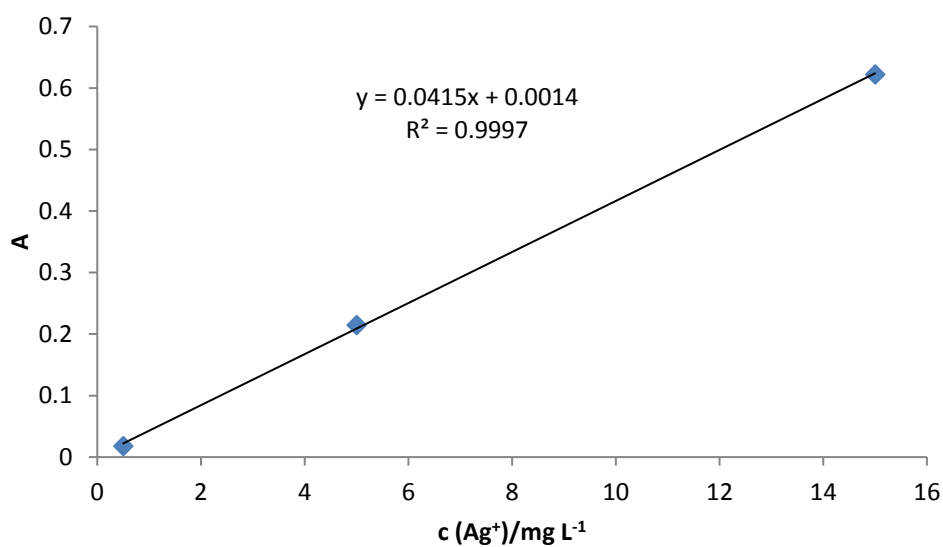
Test minimalne inhibitorne koncentracije (engl. *Minimal inhibitory concentration*, MIC) nanokompozita proveden je prema CLSI uputama (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*). Sve bakterije uzgajane su na Mueller Hinton agaru. Bakterijske stanice inokulirane su u mikrotitarske pločice s 96 jažica (125 μL Mueller Hinton medija + bakterije) tako da je konačna koncentracija bakterija u svakoj jažici bila oko 10^6 CFU/mL. Izvedena su

sljedeća serijska razrjeđenja otopine nanokompozita: 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,125 i 3 $\mu\text{g/mL}$. Za svaku koncentraciju ispitivanog antibakterijskog sredstva korištene su tri jažice. Tako pripremljena pločica stavljena je na inkubaciju na 35 °C tijekom 18 sati. Rezultati mikrotitar pločice očitani su vizualnom usporedbom s kontrolnim jažicama, a promjena boje ili talog u jažici upućivao je na razvoj bakterija. Minimalna inhibitorna koncentracija odgovara najmanjoj koncentraciji (najveće razrjeđenje) čestica nanokompozita srebra i huminske kiseline koji je inhibirao razvoj bakterija.

6. REZULTATI I OBRADA

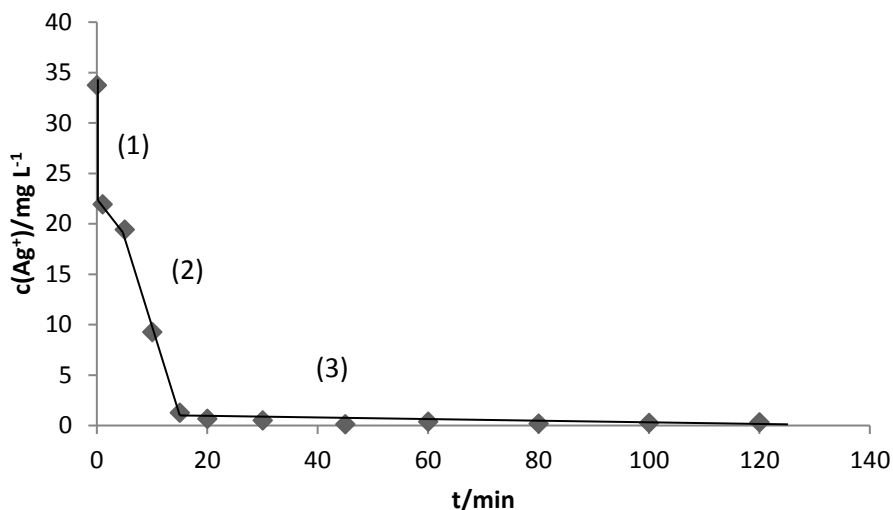
6.1 Kalibracijski dijagram analize Ag^+ iona

Proces stvaranja nanokompozita između srebra i huminske kiseline utvrđivan je mjerenjem rezidualne koncentracije srebrnih iona u vodenoj otopini plamenom atomskom apsorpcijskom spektrometrijom. Na slici 17. prikazan je kalibracijski dijagram za određivanje koncentracije srebra koristeći standardne otopine koncentracija: 0,5, 5 i 15 mg/L.



Slika 6: Kalibracijski dijagram za analizu koncentracije Ag^+

6.2. Utjecaj vremena kontakta (kinetika)

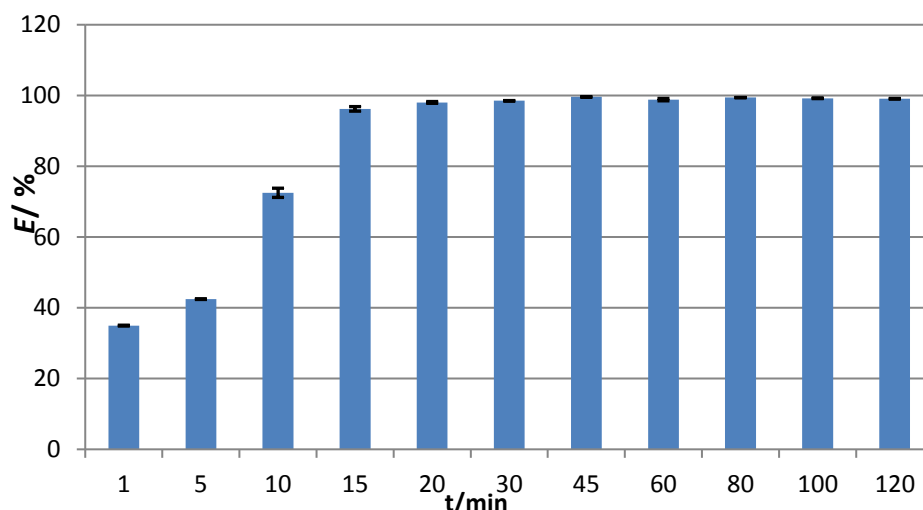


Slika 7: Rezidualna koncentracija Ag^+ iona u otopini u vremenima: 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 80, 100, 120 minuta; $\text{pH}_{\text{inicijalna}}=6$; $c(\text{Ag}^+)_{\text{inicijalna}}=33,75 \text{ mg/L}$; (1) brza adsorpcija/precipitacija Ag^+ na huminsku kiselinu; (2) postupno prekrivanje površine huminske kiseline; (3) uspostavljanje ravnoteže adsorpcije/precipitacije

Kinetika adsorpcije/precipitacije srebrnih iona na huminsku kiselinu grafički je prikazana na slici 18. Stvaranje kompleksa praćeno je smanjenjem koncentracije Ag^+ iona u otopini. Iz grafičkog prikaza uočava se da smanjenje koncentracije Ag^+ iona nije linearan proces, već su uočena tri segmenta: (1) vrlo brza adsorpcija/precipitacija Ag^+ iona na huminsku kiselinu u prvoj minuti praćena naglim smanjenjem koncentracije u otopini, (2) postepeno prekrivanje površine huminske kiseline od 1. do 15. minute i (3) uspostavljanje ravnoteže nakon 15 minute.

Samo formiranje nanokompozita nije u potpunosti jasan proces, stoga možemo govoriti samo u pretpostavkama. U uočena tri segmenta odvija se sljedeće:

1. Ionska izmjena H^+ iona na huminskoj kiselini (iz različitih funkcionalnih skupina) s Ag^+ ionima iz početne otopine
2. Redukcija Ag^+ iona u Ag^0 pri čemu najprije dolazi do nukleacije, rasta u klastere te se konačno formiraju nanočestice srebra (AgNČ) nakon čega slijedi njihovo smještanje na površinsku strukturu huminske kiseline (sterička stabilizacija AgNČ)
3. Upostavljanje ravnoteže adsorpcije/precipitacije

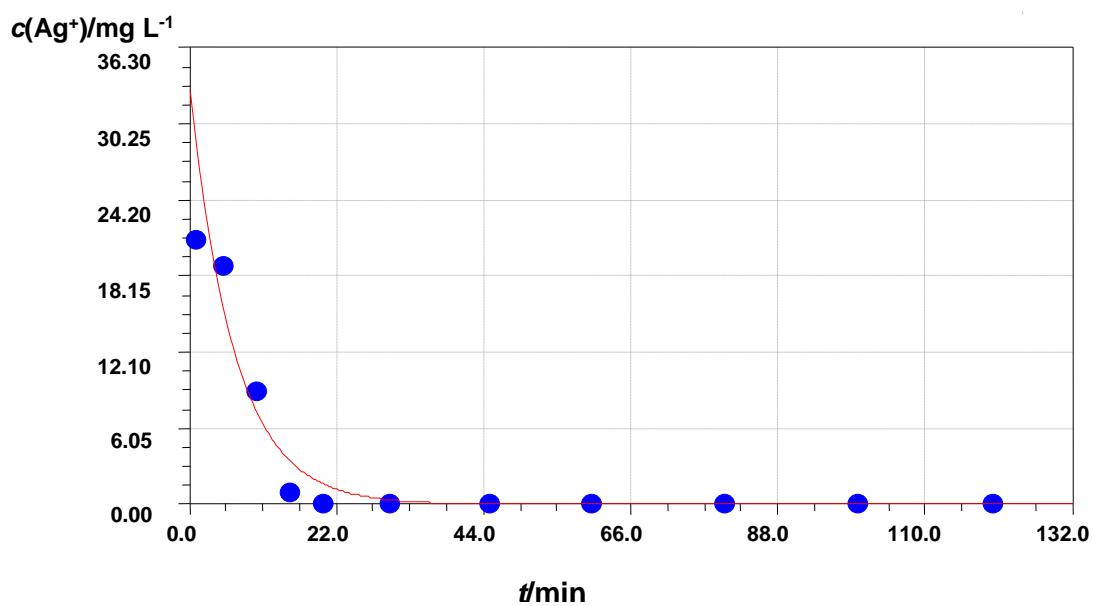


Slika 8: Učinkovitost adsorpcije/precipitacije Ag^+ iona na huminsku kiselinu u ovisnosti o vremenu t

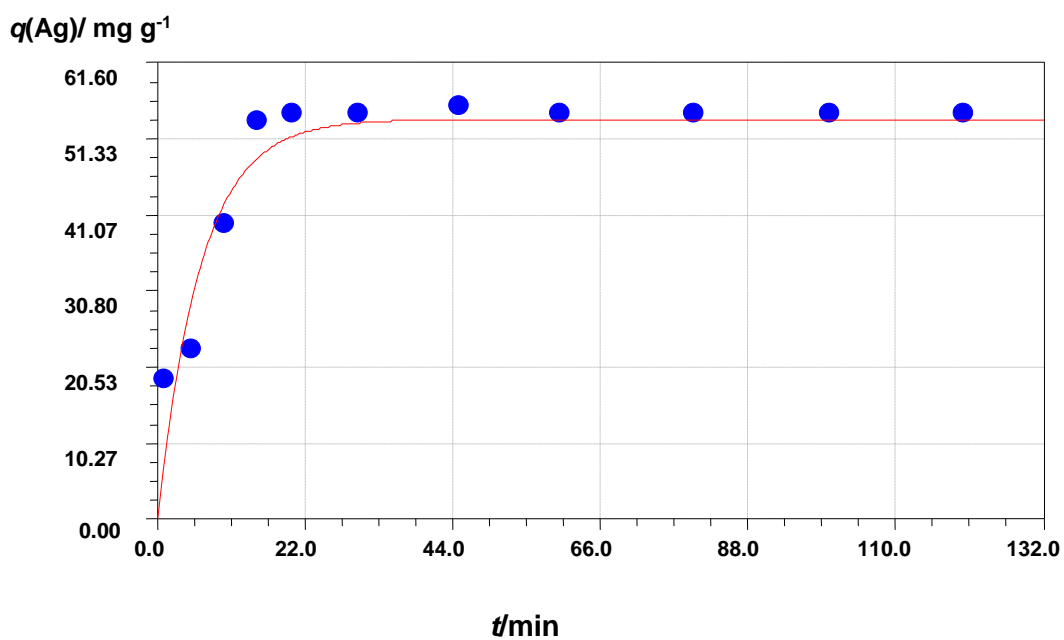
Na slici 19. prikazana je učinkovitost adsorpcije/precipitacije srebra na huminsku kiselinu ovisno o vremenu. Prvih deset minuta provedbe sinteze pomoću huminske kiseline uklonjeno je oko 72 % srebrnih iona iz otopine. Nakon uspostavljanja ravnoteže (nakon 15 minuta) čak preko 99 % Ag^+ iona iz otopine je adsorbiralo/precipitalo na huminsku kiselinu uz kapacitet sorpcije od 54,12 mg/g.

Kako bi se istražilo da li dolazi do promjene pH vrijednosti prilikom sinteze nanokompozita, priređen je jedan testni uzorak u kojem su huminska kiselina i otopina Ag^+ iona, $c(\text{Ag}^+) = 30 \text{ mg/L}$, ostavljene u kontaktu 60 minuta. Rezultati pokazuju da neposredno nakon miješanja tih dviju komponenti, pH vrijednost iznosi 10,12, a nakon 60 minuta vrijednost pada na $\text{pH} = 8,26$. Smanjenje pH vrijednosti ukazuje da je u procesu stvaranja nanokompleksa došlo do deprotonacije, tj. otpuštanja H^+ iona što je u skladu s pretpostavljenim mehanizmom sinteze prema kojem u prvom koraku dolazi do ionske izmjene H^+ iona s huminske kiseline Ag^+ ionima iz otopine.

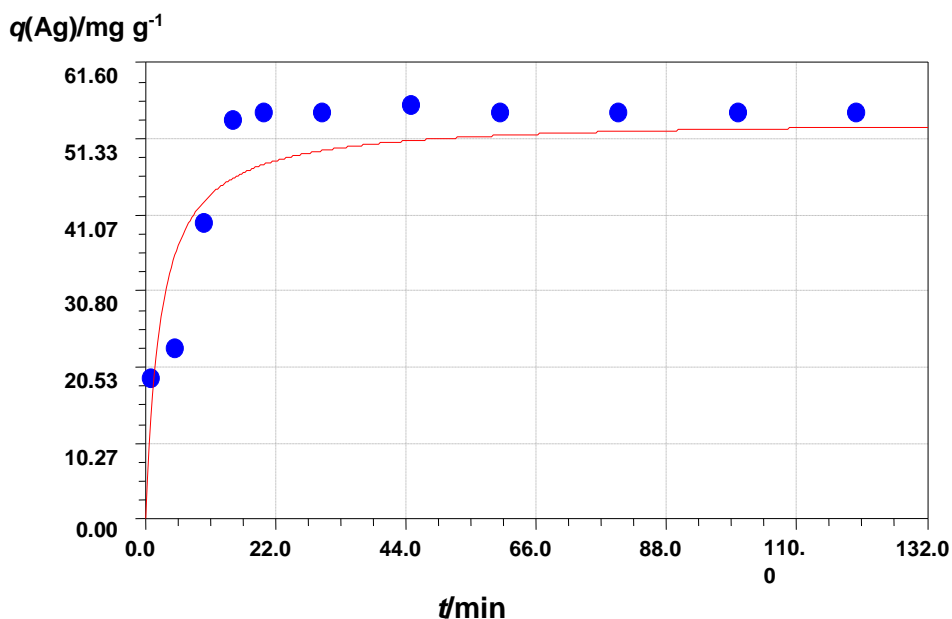
Konstante brzine adsorpcije/precipitacije srebra na huminsku kiselinu određene su iz linearnih segmenata prve dvije faze primjenjujući kinetički model nultog reda. Dobivene vrijednosti k_0 ukazuju da je brzina adsorpcije/precipitacije u prvom koraku veća ($k_0 = 11,8 \text{ mgL}^{-1}$) u usporedbi s drugim korakom ($k_0 = 2,16 \text{ mgL}^{-1}$) što je prikazano na slici 18.



Slika 20: Kinetika adsorpcije/precipitacije srebra na huminsku kiselinu: slaganje eksperimentalnih rezultata (plave točke) s kinetičkim modelom prvog reda



Slika 21: Kinetika adsorpcije/precipitacije srebra na huminsku kiselinu: slaganje eksperimentalnih rezultata (plave točke) s kinetičkim modelom pseudo prvog reda



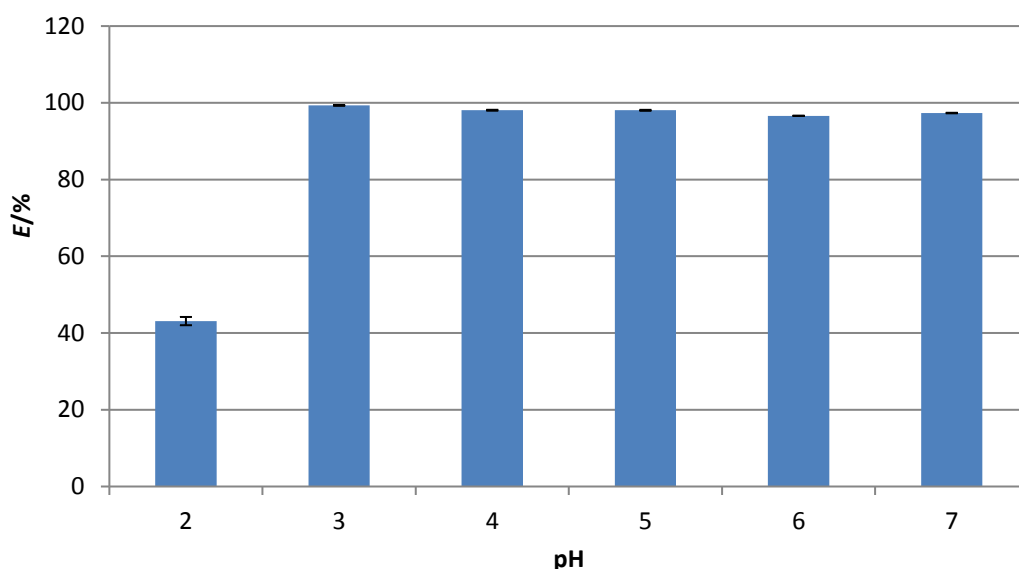
Slika 9: Kinetika adsorpcije/precipitacije srebra na huminsku kiselinu: slaganje eksperimentalnih rezultata (plave točke) s kinetičkim modelom pseudo drugog reda

Grafički prikazi slaganja primijenjenih kinetičkih modela s eksperimentalnim rezultatima prikazani su na slikama 20, 21 i 22. Primjenom programa *CurveExpert 1.4 Basic* određene su kinetičke konstante i statističke vrijednosti prikazane u tablici 6. Statistički pokazatelji: koeficijent korelacije (R) i standardna devijacija (S) pokazuju da je kinetiku adsorpcije/precipitacije srebra na huminsku kiselinu najtočnije opisati kinetikom pseudo prvog reda jer je u tom slučaju ostvareno najbolje slaganje eksperimentalnih rezultata s modelom. Značajno bolje slaganje rezultata s modelom pseudo prvog reda u odnosu na model pseudo drugog reda ukazuje da je veća vjerojatnost fizisorpcije srebra na huminsku kiselinu nego kemisorpcije. Iz tog razloga može se pretpostaviti vrlo slabo vezivanje srebra na površinu huminske kiseline ili sama precipitacija što je vjerojatnije od čvrstog vezanja kemijskim vezama.

Tablica 6: Parametri kinetičkih modela adsorpcije/precipitacije srebra na huminsku kiselinu

Model nultog reda		Model prvog reda		Model pseudo prvog reda		Model pseudo drugog reda	
1.korak		$C_e/\text{mg L}^{-1}$	1,276	$q_e/\text{mg g}^{-1}$	54,12	$q_e/\text{mg g}^{-1}$	54,12
$k_0/\text{mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$	11,8	k_1/min^{-1}	0,1507	k_{p1}/min^{-1}	0,1569	$k_{p2}/\text{g mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$	0,0073
2.korak		S	2,66	S	3,28	S	5,85
$k_0/\text{mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$	2,16	R	0,9717	R	0,9806	R	0,9515

6.3. Utjecaj inicijalne pH vrijednosti

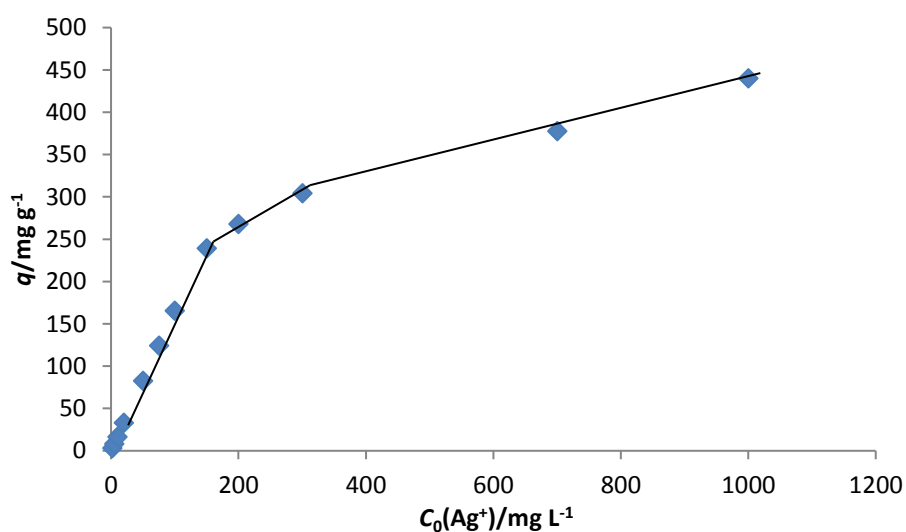


Slika 23: Učinkovitost adsorpcije/precipitacije Ag⁺ iona na huminsku kiselinu ovisno o različitim inicijalnim pH vrijednostima; $c_0(\text{Ag}^+) = 33,75 \text{ mg/L}$, $t=60 \text{ min}$

Na slici 23. prikazana je učinkovitost adsorpcije/precipitacije srebra na huminsku kiselinu ovisno o različitim inicijalnim pH vrijednostima otopine u kojoj se odvija proces. Pri pH = 2 učinkovitost je 43,1 % dok na svim ispitivanim većim pH vrijednostima od 3 do 7 učinkovitost je veća od 98 %. Razlog niske učinkovitosti pri pH = 2 pripisuje se tome što je otopina u tom slučaju prekisela, odnosno, Ag⁺ ioni se natječu s brojnim H⁺ ionima za zauzimanje mjesta na huminskoj kiselini. Povećanje pH vrijednosti s pH = 2 na više vrijednosti utjecalo je na povećanje kapaciteta adsorpcije/precipitacije srebra na huminsku

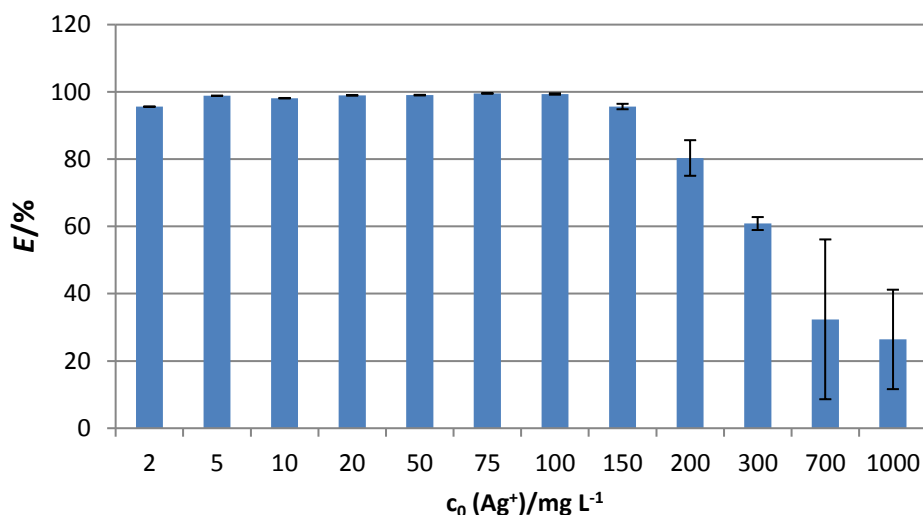
kiselinu što se pripisuje tome da su u tom području pH aktivne funkcionalne grupe deprotonirane čime se omogućuje prihvaćanje kationskog srebra u većoj mjeri. Nakon $\text{pH} = 3$ kapacitet adsorpcije/precipitacije dostiže vrijednost do 55,87 mg/g. U alkalnim uvjetima srebro ima tendenciju precipitirati jer se formira AgOH stoga se pH vrijednosti iznad 7 nisu ispitivale.

6.4 Utjecaj početne koncentracije Ag^+ iona



Slika 10: Utjecaj inicijalne koncentracije Ag^+ iona na kapacitet adsorpcije/precipitacije srebra na huminsku kiselinu

Na slici 24 prikazano je kako različita početna koncentracija Ag^+ iona u otopini utječe na kapacitet adsorpcije/precipitacije srebra na površini huminske kiseline. Vidljivo je da što je veća koncentracija, kapacitet se također povećava. Naime, aktivna mjesta na huminskoj kiselinu za prihvaćanje Ag^+ iona su fiksna te kako koncentracija Ag^+ iona raste, više tih mjesta je zauzeto. Do koncentracije 200 mg/L vidljiv je strm porast kapaciteta adsorpcije/precipitacije nakon čega se nagib krivulje smanjuje. Razlog tome je što kod visokih koncentracija u jednom trenutku dolazi do drastičnog iscrpljivanja aktivnih mjesta na huminskoj kiselinu. Primjenom koncentracija većih od 1000 mg/L pretpostavlja se da bi u jednom trenu došlo do stvaranja ravnog platoa što je posljedica zasićenja svih aktivnih mjesta.



Slika 25: Učinkovitost adsorpcije/precipitacije ovisno o inicijalnoj koncentraciji Ag^+ iona

Za razliku od kapaciteta adsorpcije/precipitacije, učinkovitost adsorpcije/precipitacije s porastom koncentracije Ag^+ iona pada kao što je vidljivo na slici 25. Najveća učinkovitost ostvaruje se pri koncentraciji od 100 mg/L te iznosi 99,37 %. Pri koncentraciji od 1000 mg/L učinkovitost je svega 26,41 %. Takav rezultat je logičan jer na huminskoj kiselini je ograničen broj raspoloživih mjesta za precipitaciju srebra. Što je veća početna koncentracija, sva mjesta su prije zauzeta i više Ag^+ iona ne pronalazi mjesto na sorbensu.

6.5 Karakterizacija huminskih kiselina i nanokompozita $\text{AgN}\check{\text{C}}/\text{MHK}$

6.5.1 Elementarna analiza (C,N,H)

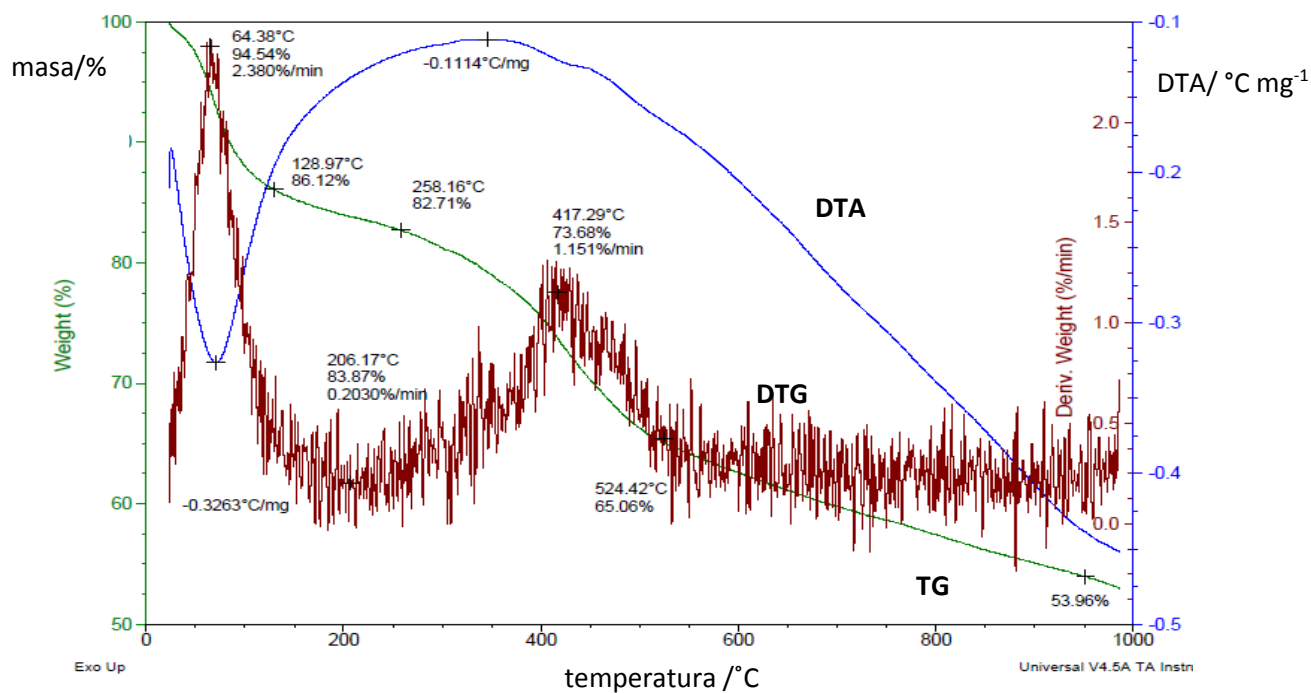
Tablica 7: Elementarna analiza nemodificirane (HK) i modificirane (MHK) huminske kiseline

Uzorak	N(%)	C(%)	H(%)
HK	0,793	36,41	3,51
MHK	1,048	44,23	2,02

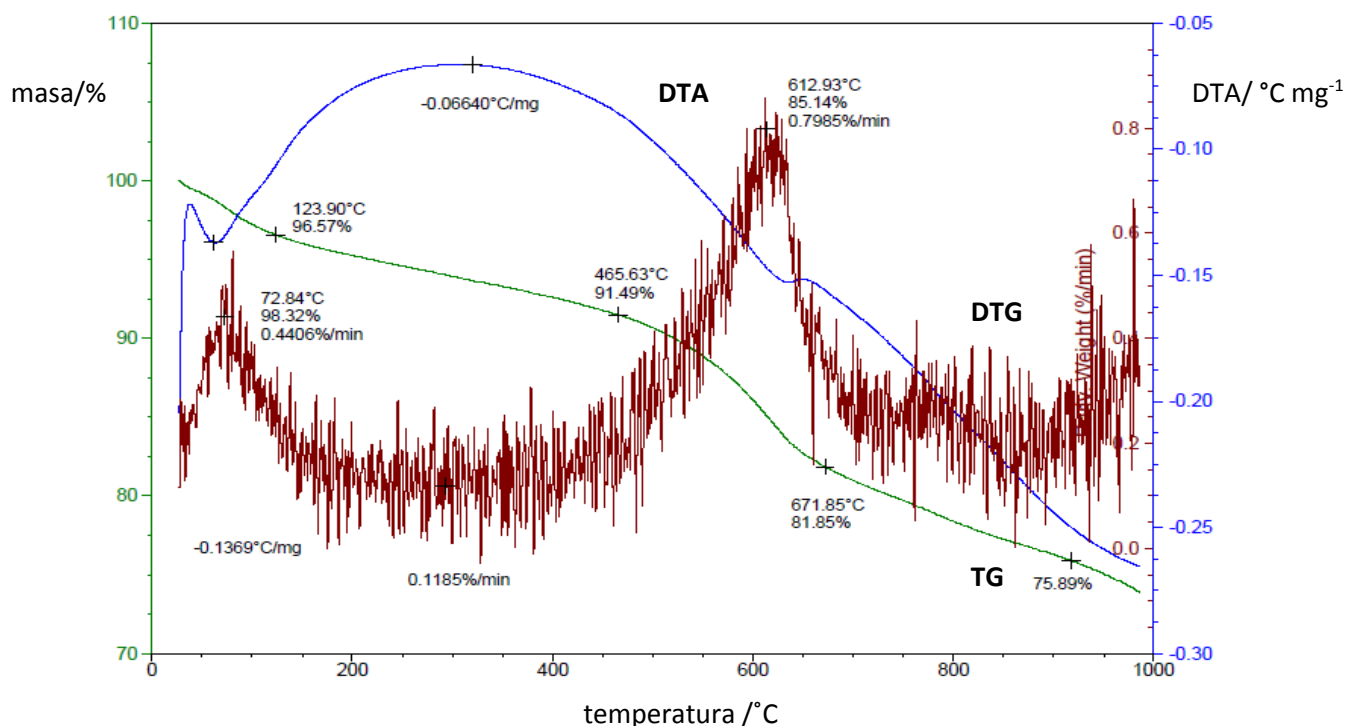
Rezultati elementarne analize iz tablice 7. pokazuju da je nakon modifikacije huminske kiseline povećan sadržaj dušika i ugljika, a smanjen sadržaj vodika. Razlog tome je da modifikacijom dolazi do promjena u sadržaju funkcionalnih skupina budući da neke funkcionalne grupe nestaju, a drugima se povećava udio. U oba slučaja najveći udio ima

ugljik. Modificirana huminska kiselina ima veći sadržaj ugljika (44,23 %) od nemodificirane huminske kiseline (36,41 %). Takav rezultat pokazuje da je modifikacijom huminske kiseline primjenom termičke metode znatno smanjen sadržaj vode što je vidljivo i u rezultatima termogravimetrijske analize.

6.5.2 Termogravimetrijska analiza (TGA)



Slika 11: TG, DTA i DTG krivulja huminske kiseline



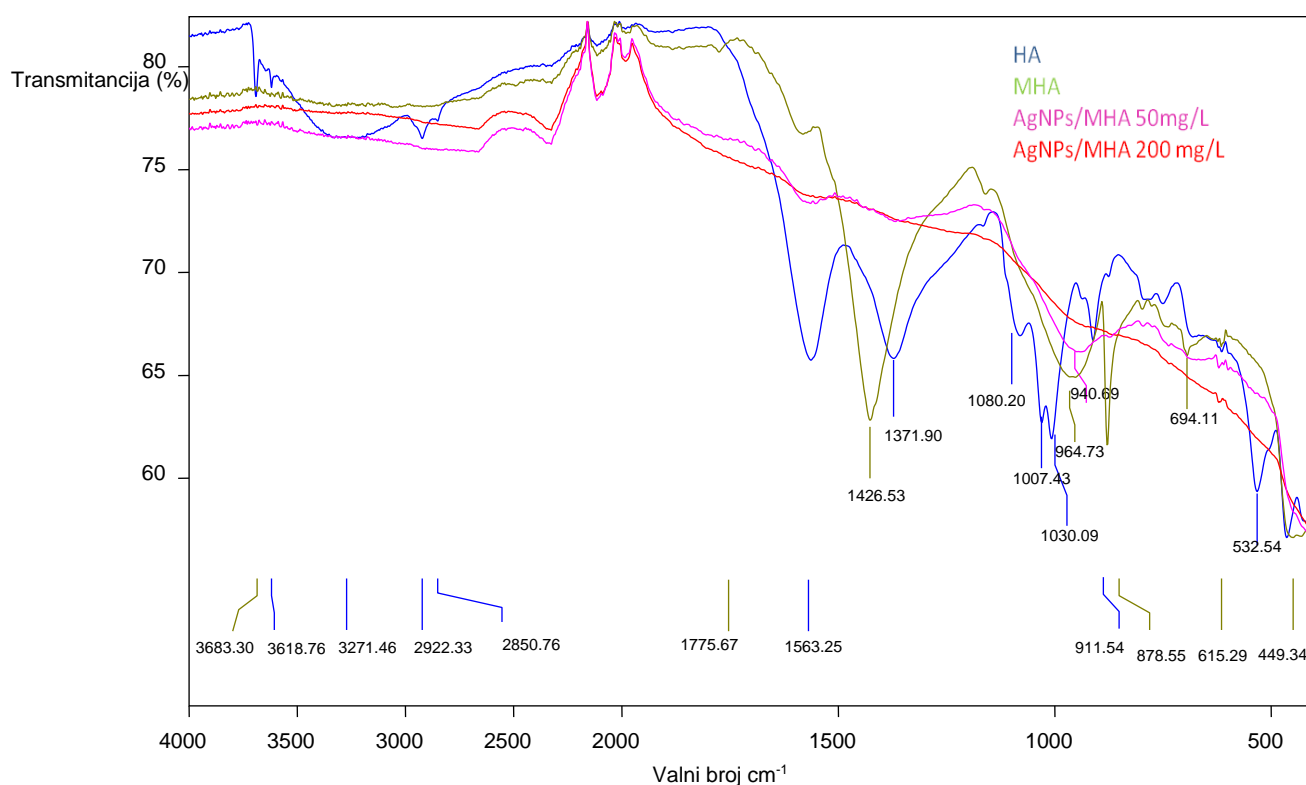
Slika 27: TG, DTA i DTG krivulja modificirane huminske kiseline

TG, DTA i DTG krivulje termičke stabilnosti nemodificirane i modificirane huminske kiseline prikazane su na slici 26 i 27. Uočavaju se četiri faze gubitka mase uslijed zagrijavanja materijala. Prve dvije faze za nemodificiranu huminsku kiselinu pojavljuju se u temperaturnom rasponu 60-380 °C s gubitkom mase od 17,29 % dok za modificiranu huminsku kiselinu u rasponu 60-460 °C s masenim gubitkom od 8,51 %. Gubitak mase u te dvije faze posljedica je gubitka fizikalno vezane vode (dehidracija) iz huminske kiseline. Proces dehidracije izražen je pikovima DTG krivulje pri temperaturi od 64,38 i 206,17 °C za nemodificiranu huminsku kiselinu te pri 72,84 °C za modificiranu huminsku kiselinu. Veći gubitak vode uočen je kod nemodificirane huminske kiseline budući da je modifikacija provedena termičkom metodom čime je modificirana huminska kiselina u samom početku imala manji sadržaj vode od nemodificirane što je u skladu s većim udjelom ugljika u modificiranoj huminskoj kiselini određenom elementarnom analizom.

Treća faza u kojoj je izgubljeno još 8,62 % mase nemodificirane huminske kiseline javlja se u rasponu 380-530 °C s DTG pikom pri 417,29 °C. Usporedno s time, za modificiranu huminsku kiselinu u trećoj fazi (460-670 °C) uočen je maseni gubitak od 9,64 % s DTG pikom pri 612,93 °C. Ova faza povezana je s procesom dehidoksilacije huminske kiseline. Četvrta faza redukcije mase javlja se u rasponu 530-1000 °C uz gubitak od 11,1 % za nemodificiranu HK te u rasponu od 670-1000 °C uz gubitak od 5,96 % za modificiranu

HK.DTA krivulja kod oba uzorka pokazuje sljedeće: pri 64 °C za nemodificiranu HK i pri 72 °C za modificiranu HK uočava se po jedan endotermni pik čija prisutnost ukazuje na fizikalnu promjenu. Taj pik znatno je manji kod modificirane huminske kiseline jer ima manji udio vode za izgubiti. Široki egzotermni pik pri 350 °C za nemodificiranu HK i pri 325 °C za modificiranu HK odnosi se na oslobađanje topline uslijed razgradnje funkcionalnih skupina.

6.5.3 Infracrvena spektrometrija s Fourierovom transformacijom signala (FTIR)



Slika 28: FTIR apsorpcijski spektar huminske kiseline prije i nakon modifikacije te nanokompozita AgNČ/MHK, $c(\text{Ag}^+) = 50$ i 200 mg/L

FTIR analiza korištena je za praćenje funkcionalnih grupa u strukturi huminske kiseline prije i nakon modifikacije te sintetiziranog nanokompozita s koncentracijama, $c(\text{Ag}^+) = 50$ i 200 mg/L . Zajednički FTIR spektar prikazan je na slici 28.

Prije svega potrebno je usporediti spektar nemodificirane i modificirane huminske kiseline kako bi se ukazalo do kojih strukturnih promjena dolazi nakon modifikacije.

Nekoliko pikova nemodificirane huminske kiseline (plavo) je istaknuto: pikovi pri 3618 i 3271 cm^{-1} odgovaraju istezanju O-H veze u alkoholu, fenolu i karboksilnoj kiselini. Istezanje C-H veze iz aldehida, alkana i alkena pokazuje pikove pri 2922 i 2850 cm^{-1} . Najizraženiji pikovi su pri 1563 i 1371 cm^{-1} što odgovara C-H savijanju iz metilne skupine te O-H savijanju iz karboksilne skupine, fenola i alkohola. Također navedene vibracije mogu se pripisati i prisutnosti veza C=C, C=N te C=O. Pikovi od 911 do 1371 cm^{-1} odnose se na C-O, C-N i C-C istezanje. Fluktuacije oko 2000 cm^{-1} dogovaraju vibracijama dijamanta koji je pri snimanju FTIR spektra korišten kao podloga za uzorak.

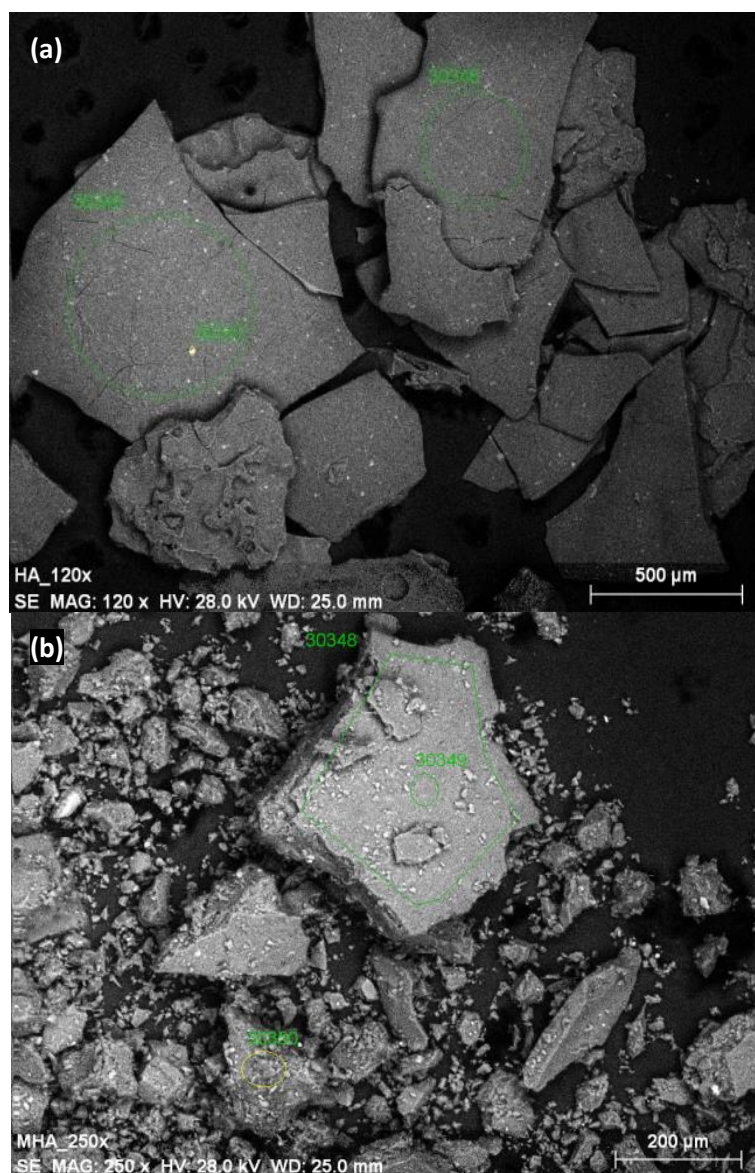
Nakon modifikacije huminske kiseline ključna promjena je da se udio nekih funkcionalnih grupa povećao dok su neke skoro u potpunosti nestale. Valni brojevi veći od 2000 cm^{-1} pokazuju gubitak vibracija koje potječu od istezanja veza funkcionalnih skupina s O-H i N-H vezama. Pomakom pri nižim valnim brojevima uočava se najistaknutiji pik pri 1426 cm^{-1} koji ukazuje da je došlo do povećanja udjela C-H, C=C, C=O i O-H savijanja. S obzirom na povećanje sadržaja navedenih skupina može se zaključiti da su one u najvećoj mjeri odgovorene za interakciju s nanočesticama srebra. Skupine s O-H vezom (alkohol, fenolne i karboksilne skupine) smatraju se ključnima u adsorpciji/precipitaciji srebra jer imaju mogućnost ionske izmjene H^+ iona s Ag^+ ionima.

Snimanjem FTIR spektra za nanokompozit $\text{AgNČ}/\text{MHK}$ niske i visoke početne koncentracije Ag^+ iona može se uočiti da su funkcionalne skupine s površine huminske kiseline gotovo u potpunosti zaposjednute nanočesticama srebra te je vidljivo pravilno smanjenje u intezitetu pikova kako se poveća primijenjena koncentracija. Primjerice, kod $c(\text{Ag}^+) = 200 \text{ mg/L}$ (crveno) ne registrira se nijedan pik što znači da je površina u slučaju visoke koncentracije srebra u potpunosti prekrivena nanočesticama. To ukazuje da sve registrirane funkcionalne skupine modificirane huminske kiseline sudjeluju u adsorpciji/precipitaciji srebra i ostvaruje se potpuna prekrivenost površine.

6.5.4 Skenirajuća elektronska mikroskopija s EDX detektorom

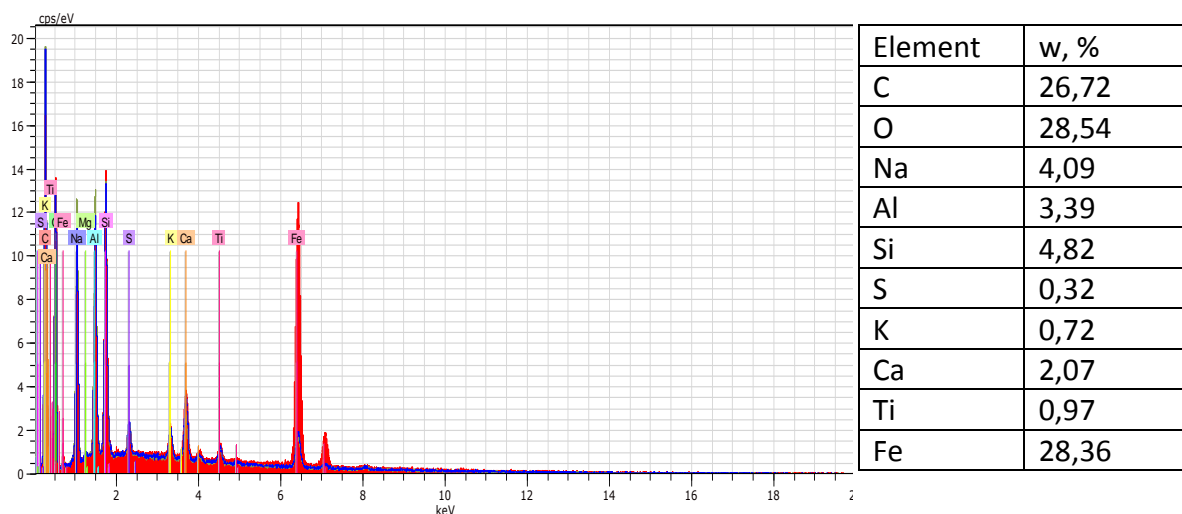
Morfološke karakteristike površine nemodificirane i modificirane huminske kiseline te sintetiziranog nanokompozita $\text{AgNČ}/\text{MHK}$ koncentracije srebrovih iona, $c = 50$ i 200 mg/L ispitivane su skenirajućim elektronskim mikroskopom. Na slici 29 i 32 prikazane su SEM slike nemodificirane i modificirane huminske kiseline. Nemodificirana huminska kiselina sadrži čestice pločastog oblika, glatke i ravne površine. Modifikacijom je značajno smanjen udio čestica pločastog oblika pri čemu su čestice rastavljene na manje komponente. U ovom

slučaju ne možemo govoriti o tome koji oblik huminske kiseline je bolji za uklanjanje srebra, no svrha modifikacije u ovom radu bila je dobivanje netopljivog oblika huminske kiseline čime je olakšano uklanjanje sintetiziranog nanokompozita AgNČ/MHK od rezidualnog srebra iz otopine.

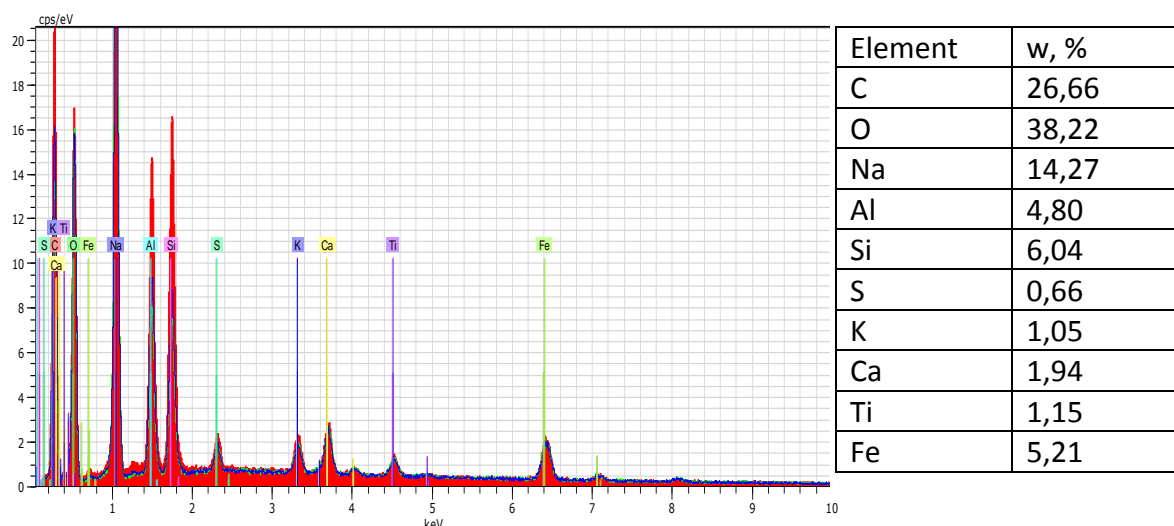


Slika 129: SEM fotografija: (a) nemodificirane i (b) modificirane huminske kiseline

Elementarna analiza adsorbenta dobivena je iz EDX spektra za nemodificiranu i modificiranu huminsku kiselinu (slike 30 i 31).

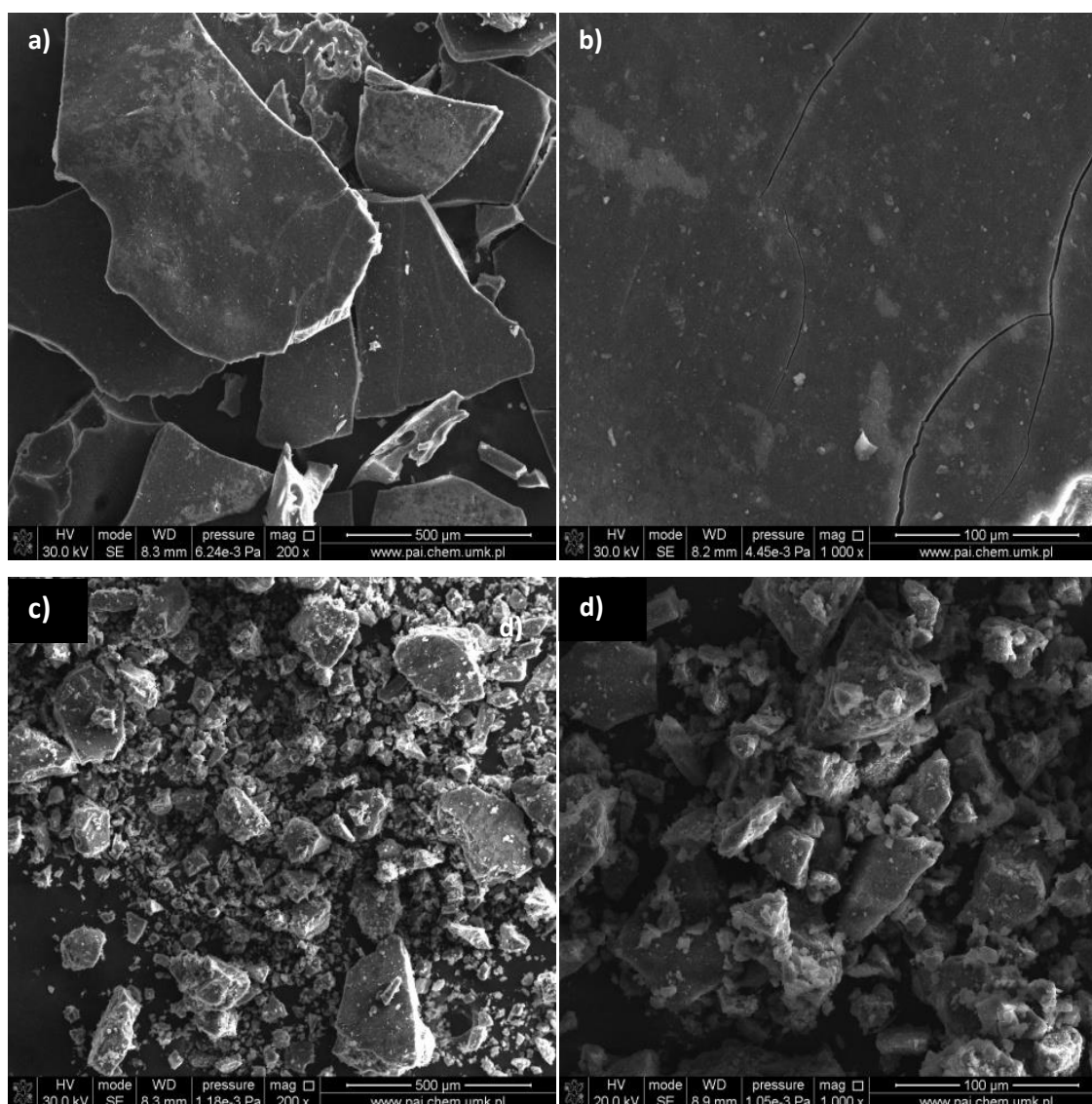


Slika 30: EDX spektar nemodificirane huminske kiseline



Slika 31: EDX spektar modificirane huminske kiseline

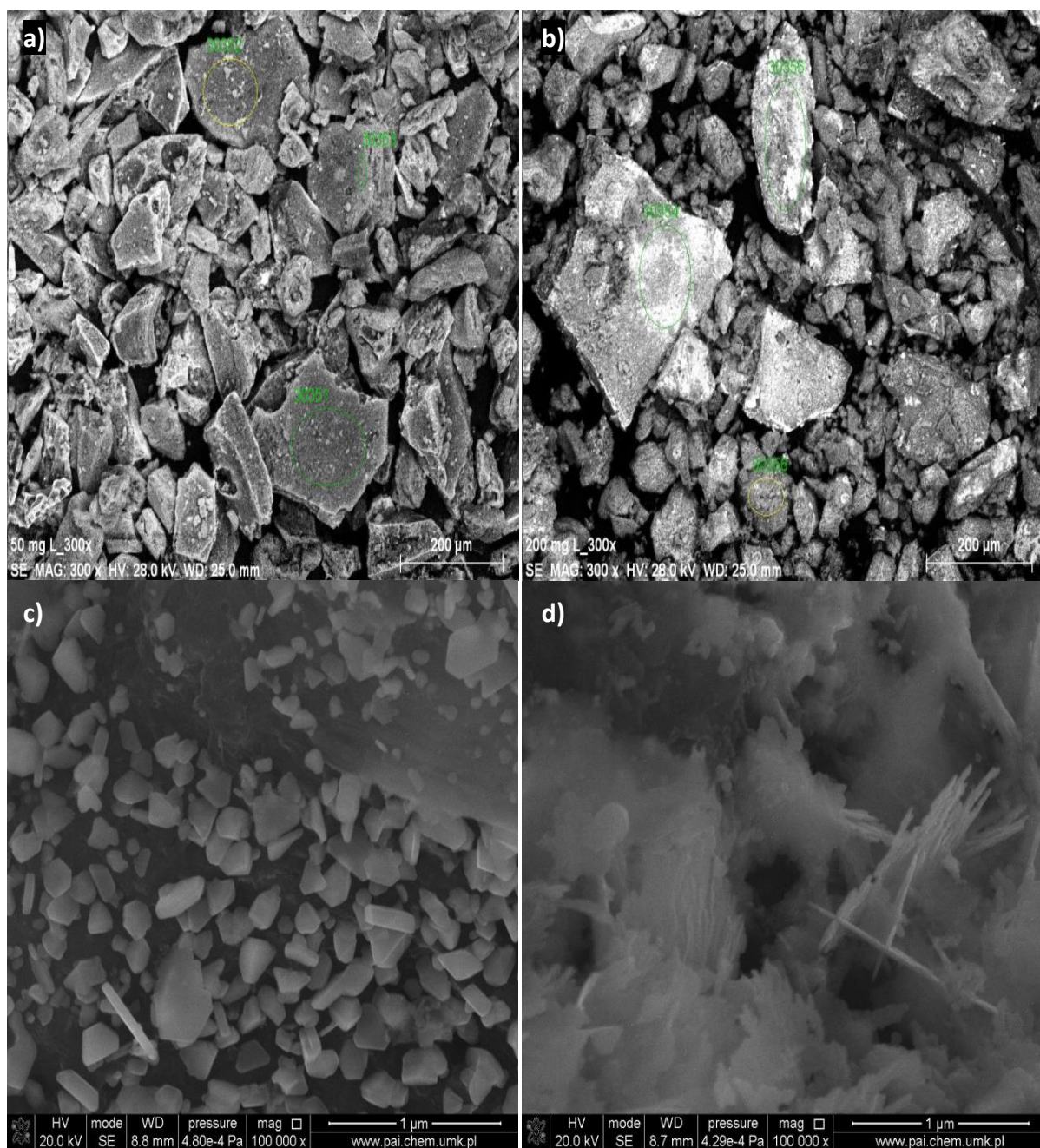
Prema zastupljenosti elemenata na površini nemodificirane huminske kiseline ističu se ugljik, kisik, natrij i željezo. Uspoređujući modificiranu i nemodificiranu huminsku kiselinu vidljivo je da je sadržaj ugljika ostao približno isti što je u skladu s organskim porijeklom. Za sorpcijska svojstva zanimljiva je promjena sadržaja kisika. Modifikacijom se povećao sadržaj kisika čime se indicira da je površina naklonjena sorpciji.



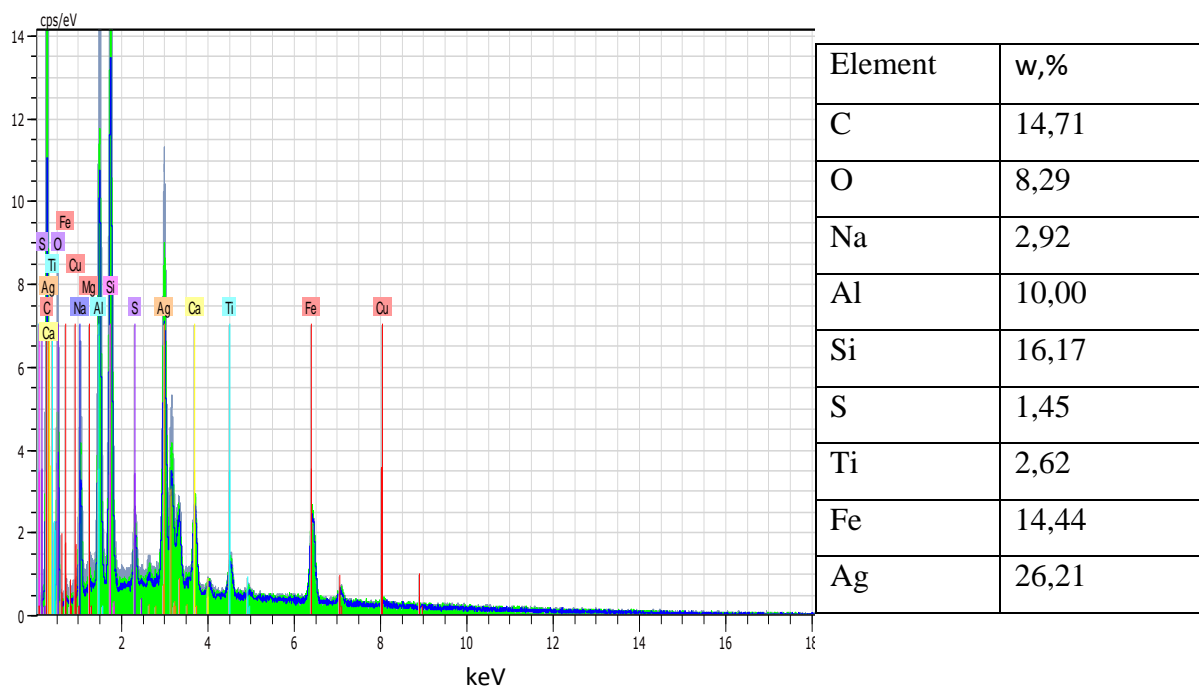
Slika 32: SEM slika visoke rezolucije: nemodificirana huminska kiselina: a) uvećanje 200 x b) uvećanje 1000 x; modificirana huminska kiselina: c) uvećanje 200 x , d) uvećanje 1000 x

Morfologija sintetiziranog nanokompozita AgNČ/MHK ispitana je za nisku i visoku početnu koncentraciju otopine srebrovih iona, $c(\text{Ag}^+) = 50 \text{ mg/L}$ i 200 mg/L . Usporedbom SEM fotografija na slici 33 a) i 33 b) kod koncentracije od 50 mg/L uočava se homogenija raspodjela nanokompozita po površini huminske kiseline. SEM mikroskopom visoke rezolucije na slici 33 c) i 33 d) uočeno je da su kod koncentracije od 50 mg/L nanočestice manje i osim različitih nepravilnih oblika, javlja se i sferičan oblik. Kod koncentracije od 200 mg/L uočena je neželjena pojava klastera što znači da je primijenjena prevelika koncentracija. Ukoliko želimo veću aktivnost nanočestica i homogeniju raspodjelu potrebno je koristiti manje koncentracije jer što su čestice manje, veća je njihova aktivnost. Sferičan oblik

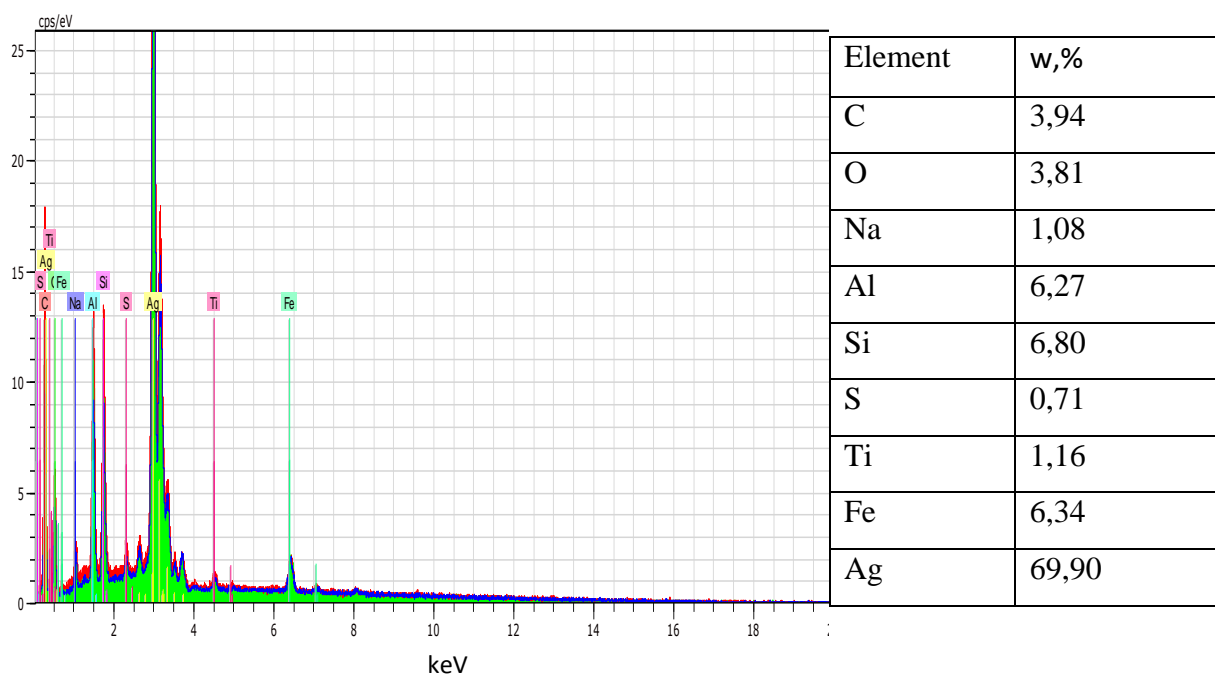
nanočestica poželjan je u slučaju antimikrobiološkog djelovanja što su pokazala brojna istraživanja koja navode da upravo sferičan oblik pokazuje najbolja svojstva za tu svrhu.



Slika 33: SEM fotografije nanokompozita AgNČ/MHK: a) 50 mg/L Ag⁺, b) 200 mg/L Ag⁺, c) SEM visoka rezolucija 50 mg/L Ag⁺, d) SEM visoka rezolucija 200 mg/L Ag⁺



Slika 13: EDX spektar modificirane huminske kiseline s nanočesticama srebra, $C_{inicijalna}(Ag^+) = 50 \text{ mg/L}$



Slika 35: EDX spektar modificirane huminske kiseline s nanočesticama srebra, $C_{inicijalna}(Ag^+) = 200 \text{ mg/L}$

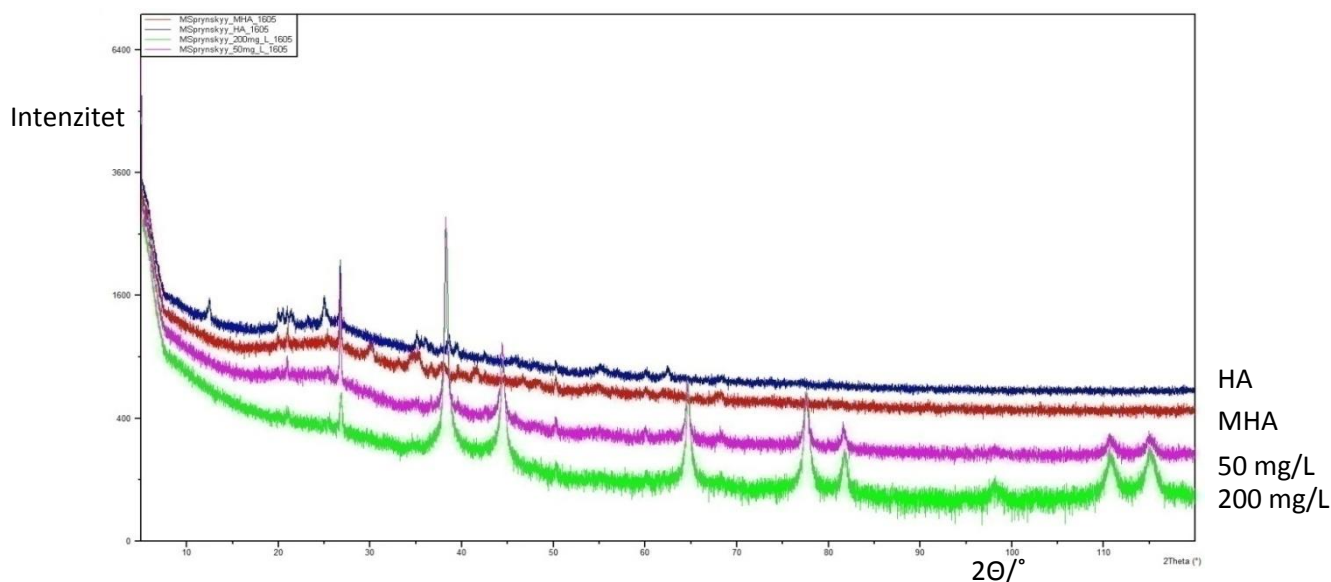
Iz EDX spektara na slici 34. i 35. vidljiva je pojava srebra na površini huminske kiseline kao dokaz stvaranja nanokompozita. Sadržaj srebra na površini veći je kod veće inicijalne koncentracije dok je sadržaj ugljika i kisika znatno manji kod veće koncentracije.

To smanjenje pripisuje se tome da je kod veće inicijalne koncentracije srebrovih iona prisutan veći kapacitet adsorpcije/precipitacije čime su navedeni elementi zauzeti nanočesticama srebra. Smanjenje pojedinih elemenata povezano je s time što funkcionalne skupine sudjeluju u adsorpciji/precipitaciji nanočestica srebra čime se smanjuje njihova koncentracija. Kod veće koncentracije ostvaruje se manja učinkovitost adsorpcije/precipitacije što je u skladu s testom ispitivanja inicijalne koncentracije srebra koji pokazuje da nakon 100 mg/L dolazi do smanjenja učinkovitosti. Smanjenje učinkovitosti izravna je posljedica stvaranja klastera čija pojava je dokazana pri $c(\text{Ag}^+) = 200 \text{ mg/L}$ na slici 33 d).

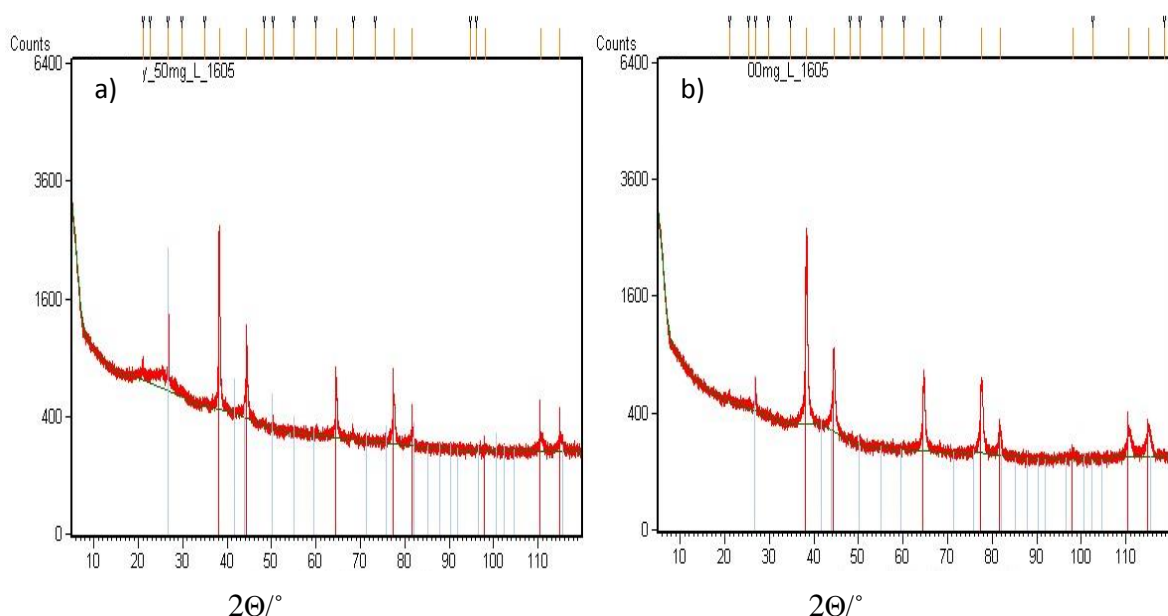
EDX spektar nanokompozita potvrdio je da je srebro većinski element sa signalom oko 3 keV čime se potvrđuje adsorpcija/precipitacija srebra na površini HK. Ostali značajni, ali slabiji signali ukazuju na prisutnost ugljika, kisika, natrija, aluminijsa i silicija koji se pripisuju organskoj i mineralnoj prirodi huminske kiseline.

6.5.5 Rendgenska difrakcija (XRD)

Difraktogrami nemodificirane huminske kiseline, modificirane huminske kiseline i sintetiziranog nanokompozita AgNČ/MHK različitih inicijalnih koncentracija Ag^+ iona snimljeni su kako bi se potvrdila prisutnost srebrnih nanočestica na površini huminske kiseline (slika 36.).



Slika 36: Usporedba difraktograma nemodificirane huminske kiseline (HK), modificirane huminske kiseline (MHK) te sintetiziranih nanokompozita inicijalnih koncentracija $c(\text{Ag}^+) = 50$ i 200 mg/L



Slika 37: Difraktogrami nanokompozita AgNČ/MHK: a) $c(\text{Ag}^+) = 50 \text{ mg/L}$, b) $c(\text{Ag}^+) = 200 \text{ mg/L}$

Rendgenska difrakcija srebra za dvije inicijalne koncentracije izdvojena je na slici 37 a) i b). Na difraktogramu se uočava 7 intenzivnih pikova vrijednosti 2θ u rasponu od 10 do 120° . Braggove refleksije odgovaraju plošno centriranoj kubičnoj strukturi te je za svaki pik određen Millerov index (tablica 8.). Intenzitet pika ukazuje na stupanj kristaliničnosti, stoga najzastupljenija je površina (111) položaja $2\theta = 38,101^\circ$.

Tablica 8. Rezultati XRD analize za srebro na površini huminske kiseline, $c(\text{Ag}^+) = 50 \text{ mg/L}$ i 200 mg/L

Br.	h	k	l	d(A)	$2\theta(^\circ)$
1	1	1	1	2,36000	38,101
2	2	0	0	2,03000	44,600
3	2	2	0	1,44000	64,678
4	3	1	1	1,23000	77,549
5	2	2	2	1,18000	81,506
6	3	3	1	0,93600	110,766
7	4	2	0	0,91300	115,077

Na temelju dobivenih rezultata XRD analize sa sigurnošću se može reći da je iz inicijalne otopine Ag^+ iona u prisutnosti huminske kiseline kao adsorbensa došlo do

formiranja nanočestica kristalinične prirode. Redukcija Ag^+ iona u elementarno srebro Ag^0 ide u prilog prethodnoj pretpostavci da huminska kiselina u sintezi nanokompozita djeluje kao redukcijsko sredstvo za formiranje nanočestica. Struktura nanokristala srebra opisuje se parametrima kristalne rešetke sažete u tablici 9.

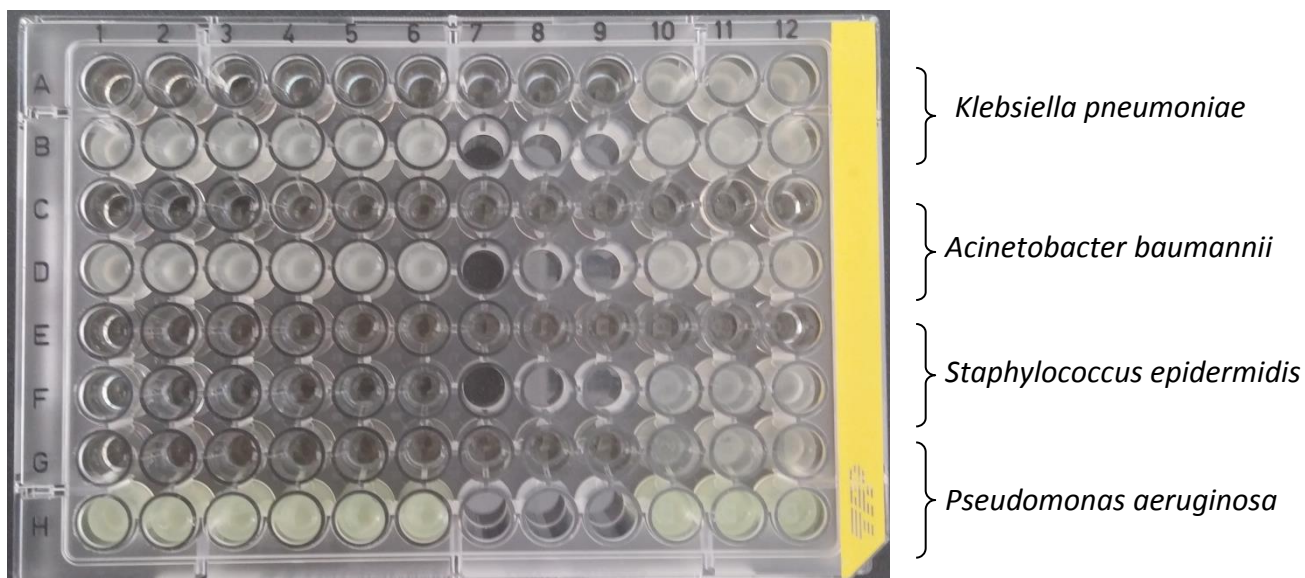
Tablica 9: Kristalografski parametri za Ag

Kristalni sustav:	Kubični
Parametri elementarne ćelije kristala	
a (Å):	4,0740
b (Å):	4,0740
c (Å):	4,0740
alfa(°):	90,0000
beta(°):	90,0000
gama(°):	90,0000
gustoća(g/cm ³)	10,50
volumen (10 ⁶ pm ³):	67,62
Broj stehiometrijskih jedinica:	4,00

6.6 Antimikrobiološko djelovanje nanokompozita AgNČ/MHK

6.6.1 Metoda minimalne inhibitorne koncentracije

Metoda minimalne inhibitorne koncentracije i disk difuzijska metoda pokazuju da sintetizirani nanokompozit pokazuje antimikrobiološko djelovanje prema svih 7 testiranih bakterija. Na slici 38. i 39. prikazani su rezultati metode minimalne inhibitorne koncentracije za 7 vrsta bakterija. Razrjeđenja su provedena u padajućem nizu s lijeva na desno po tri jažice za svaku koncentraciju: 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,125 i 3 µg/mL.



Slika 14: Metoda minimalne inhibitorne koncentracije



Slika 39: Metoda minimalne inhibitorne koncentracije

Posljednja jažica u padajućem nizu koja ne pokazuje zamućenje uzrokovano razvojem bakterija predstavlja minimalnu inhibitornu koncentraciju. Rezultati za sve bakterije sažeti su u tablici 10.

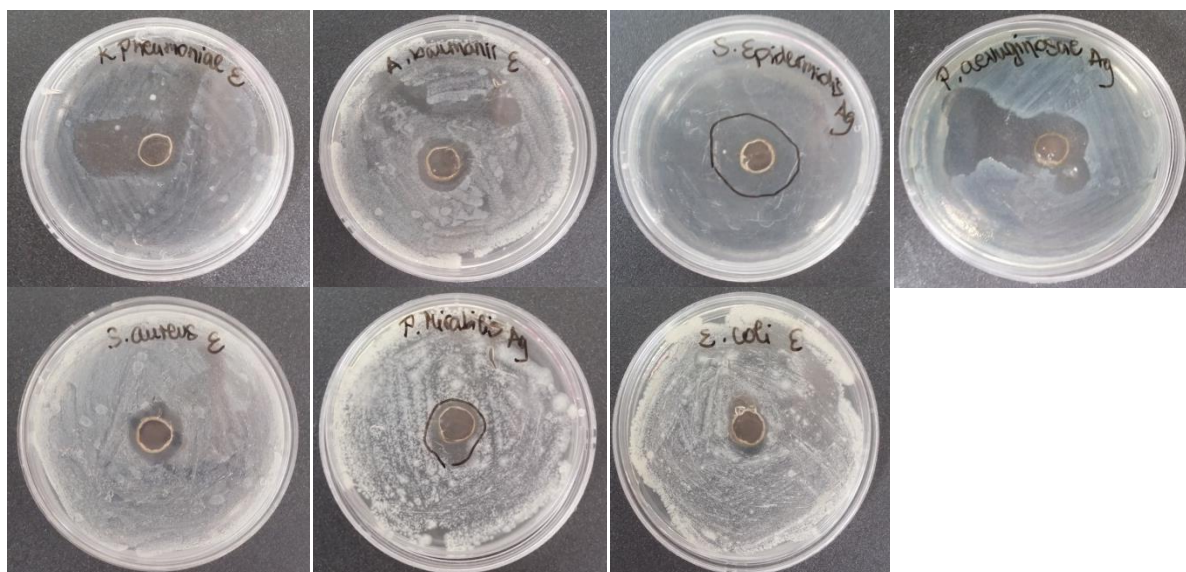
Tablica 10: Rezultati metode minimalne inhibitorne koncentracije

Bakterija	Minimalna inhibitorna koncentracija, $\mu\text{g/mL}$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100
<i>Acinetobacter baumannii</i>	50
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	< 12,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	100
<i>Proteus mirabilis</i>	100
<i>Escherichia coli</i>	100

Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da je srebro adsorbirano/precipitirano na huminskoj kiselini antimikrobiološki najučinkovitije prema bakteriji *Staphylococcus epidermidis* jer se inhibicija rasta bakterije odvija već pri koncentraciji manjoj od 12,5 $\mu\text{g/mL}$ nanokompozita srebra, zatim prema bakteriji *Acinetobacter baumannii* pri koncentraciji od 50 $\mu\text{g/mL}$ te ostale bakterije na koje pokazuje jednak učinak minimalne inhibitorne koncentracije od 100 $\mu\text{g/mL}$.

6.6.2 Analiza disk-difuzijskom metodom

Rezultati disk difuzijske metode također pokazuju osjetljivost svih bakterija na djelovanje srebrnog nanokompozita. Na temelju mjerenja promjera zone inhibicije rasta bakterija procjenjuje se antimikrobiološko djelovanje srebrnog nanokompozita. Na slici 40. prikazani su rezultati djelovanja na bakterije pri čemu se kod svake bakterije oko zone djelovanja srebra mogu uočiti čiste zone. Iako slike nisu estetski zadovoljavajuće i u slučaju daljeg istraživanja metodu bi trebalo ponovno provesti, za potrebe ovog rada dovoljna je činjenica da se kod svake bakterije uočava čista zona i potvrđuje se djelovanje sintetiziranog nanokompozita kao antibiotika.



Slika 40: Disk difuzijska metoda za ispitivanje antibiotskog djelovanja AgNC/MHK nanokompozita

7. ZAKLJUČAK

U ovom radu glavni cilj bio je sintetizirati nanokompozit srebra i huminske kiseline te karakterizirati dobiveni produkt. Početne pretpostavke bile su da će huminska kiselina s obzirom na svoja adsorpcijska svojstva uspješno ukloniti toksične Ag^+ ione iz vodene otopine te da će srebrni nanokompozit pokazivati antimikrobiološko djelovanje. Sve navedene pretpostavke pokazale su se ispravnima unatoč tome što je sam mehanizam još u velikoj mjeri nejasan.

Nizom eksperimenata utvrđeno je da se ravnoteža procesa adsorpcije/precipitacije ostvaruje nakon 15 minuta kontakta huminske kiseline i otopine Ag^+ iona. Za dobivanje optimalnih rezultata, početna pH vrijednost otopine u kojoj se provodi sinteza mora biti u intervalu od 3 do 7. Razlog tome je što se pri vrlo niskim pH vrijednostima Ag^+ ioni moraju natjecati s brojnim H^+ ionima za zauzimanje mjesta na huminskoj kiselini, a pri $\text{pH} > 7$ dolazi do stvaranja taloga AgOH . Ispitivanjem različite inicijalne koncentracije Ag^+ iona utvrđeno je da što je veća koncentracija, kapacitet adsorpcije/precipitacije se također povećava. Do koncentracije od 200 mg/L vidljiv je strm porast kapaciteta nakon čega se nagib krivulje smanjuje. Razlog tome je što kod visokih koncentracija u jednom trenutku dolazi do drastičnog iscrpljivanja aktivnih mjesta na huminskoj kiselini. Primjenom koncentracija većih od 1000 mg/L vjerojatno bi u jednom trenutku došlo do stvaranja ravnog platoa kao posljedice zasićenja svih aktivnih mjesta. Što se tiče učinkovitosti adsorpcije/precipitacije, ona je najveća u području inicijalne koncentracije Ag^+ iona 50-100 mg/L i iznosi preko 99 %.

Za istraživanje mehanizma adsorpcije/precipitacije srebra na huminsku kiselinu korišteni su različiti kinetički modeli kojima su opisuju eksperimentalni rezultati. Najbolje slaganje eksperimentalnih rezultata ostvareno je s kinetičkim modelom pseudo prvog reda. To navodi da je u ovom slučaju slabo vezanje ili sama precipitacija naklonjeniji proces od čvrstog kemijskog vezanja srebra za huminsku kiselinu.

Primjenom različitih instrumentalnih metoda karakterizirane su nemodificirana i modificirana huminska kiselina te sintetizirani nanokompozit niske i visoke koncentracije. FTIR analizom utvrđeno je da u interakciji s nanočesticama srebra u najvećoj mjeri sudjeluju O-H veze iz alkoholne, karboksilne i fenolne skupine što se objašnjava njihovom sposobnošću da izmjene svoj proton s Ag^+ ionom iz otopine.

Na temelju dobivenih rezultata XRD analize sa sigurnošću se može reći da je iz inicijalne otopine Ag^+ iona u prisutnosti huminske kiseline došlo do formiranja nanočestica

kristalinične prirode. Redukcija Ag^+ iona u metalno srebro Ag^0 ide u prilog prethodnoj pretpostavci da huminska kiselina u sintezi nanokompozita djeluje kao redukcijsko sredstvo za formiranje nanočestica. Struktura nanokristala srebra opisuje se plošno centriranom kubičnom rešetkom.

Usporedbom SEM-EDX fotografija pri koncentracijama od 50 i 200 mg/L Ag^+ iona, uočava se homogenija raspodjela nanokompozita po površini huminske kiseline u slučaju niže koncentracije. Kod koncentracije od 50 mg/L nanočestice su manje, a osim različitih nepravilnih oblika javlja se i sferičan oblik. Kod koncentracije od 200 mg/L uočena je neželjena pojava klastera što znači da je primijenjena prevelika koncentracija koja je dovela do agregacije. Ukoliko želimo veću aktivnost nanočestica i homogeniju raspodjelu potrebno je koristiti manje koncentracije jer što su čestice manje, veća je njihova aktivnost.

Primjenom metoda minimalne inhibitorne koncentracije i disk difuzijske metode dokazano je antimikrobiološko djelovanje sintetiziranog nanokompozita koje se pokazalo učinkovito za svih 7 testiranih bakterija. Nanokompozit pokazuje najbolje djelovanje za bakterije *Staphylococcus epidermidis* jer se inhibicija rasta bakterije odvija već pri koncentraciji manjoj od 12,5 $\mu\text{g/mL}$ nanokompozita srebra, zatim prema bakteriji *Acinetobacter baumannii* pri koncentraciji od 50 $\mu\text{g/mL}$, a za ostale bakterije pokazuje jednak učinak minimalne inhibitorne koncentracije od 100 $\mu\text{g/mL}$.

Konačno, na temelju navedenih rezultata može se zaključiti da kombinacija srebra i huminske kiseline pokazuje visok potencijal u rješavanju problema kontrole ponašanja srebra u okolišu. Srebro na nano-razini posjeduje izvanredna svojstva, a huminska kiselina je prirodan i jeftin adsorbent. Unatoč tome, ponašanje srebra još uvijek je nepoznanica kao i parametri koji utječu na njegovu toksičnost. Također, sam mehanizam interakcije s huminskom kiselinom još uvijek je nedovoljno istražen, no ovaj rad pokazuje da navedeni nanokompozit ima zanimljiva svojstva čijim daljim istraživanjem možemo imati itekakve koristi.

8. POPIS SIMBOLA

AgNČ		nanočestice srebra
HK		huminska kiselina
MHK		modificirana huminska kiselina
AgNČ/MHK		nanokompozit srebra i huminske kiseline
AAS		atomska apsorpcijska spektrometrija
EA		elementarna analiza
TGA		termogravimetrijska analiza
DTA		diferencijalna termalna analiza
FTIR		infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom
XRD		rendgenska difrakcija
SEM-EDX		pretražna elektronska mikroskopija s energodisperzivnim detektorom
MIC		minimalna inhibitorna koncentracija
DTG		diferencijalna termogravimetrija
q_t	[mg/g]	količina srebra adsorbiranog/precipitiranog u vremenu t
q_e	[mg/g]	količina srebra adsorbiranog/precipitiranog u ravnoteži
k_0	[mg/L min]	konstanta brzine reakcije nultog reda
k_1	[min ⁻¹]	konstanta brzine reakcije prvog reda
k_{p1}	[min ⁻¹]	konstanta brzine reakcije pseudo prvog reda
k_{p2}	[g/mg min]	konstanta brzine reakcije pseudo drugog reda
E	[%]	učinkovitost adsorpcije/precipitacije
C	[mg/L]	koncentracija Ag ⁺ u otopini u vremenu t
C_0	[mg/L]	početna koncentracija Ag ⁺ u otopini

9. LITERATURA

- [1] H. Etemadi, *Silver nanoparticle-polymer nanocomposites*, disertacija, (2012) 17-24
- [2] <http://encyclopedia2.thefreedictionary.com/quantum+size+effects> (Pristup: 25.06.2017.)
- [3] Q.Huy Tran, Q. Nguyen, A.Tuan Le, *Silver nanoparticles-synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives*, Advances in natural science: Nanoscience and nanotechnology, **Vol. 4**, Hanoi (2013)
- [4] A.S.Edelstein, R.C.Cammaratra, *Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications*, 2.izdanje, Washington, (1998) 89-268
- [5] V.Kumar, A.Vohra, *Nanoelectronics in Engineering Curricula*, IETE Technical Review, **Vol. 22**, Gaya (2015)
- [6] <http://www.nanowerk.com/spotlight/spotid=1781.php> (Pristup: 01.07.2017.)
- [7] A.El-Nour, A.Eftaiha, A. Al-Warthan, R.A.A.Ammar, *Synthesis and applications of silver nanoparticles*, Arabian Journal of Chemistry, **Vol. 3**, Rijad (2010)
- [8] J.Polte, *Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles*, Royal Society of Chemistry, Berlin, 2015.
- [9] N.Thanh, N. Mahiddine, N.Maclean, *Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution*, Chemical Reviews, **Vol.15**, London (2014)
- [10] J.Jung, H.Ched Oh, H.Noh, H.Ji, S.Kim, *Metal nanoparticle generation using small ceramic heater with a local heating area*, ScienceDirect, **Vol. 37**, (2006)
- [11] T.Tsuji, D.H.Thang, Y.Okazaki, M. Nakanishi, Y.Tsuboi, M.Tsuji, *Preparation of silver nanoparticles by laser ablation in polyvinylpyrrolidone solutions*, ScienceDirect, **Vol. 254**, (2008)
- [12] S.Prabhu, E.Poulose, *Silver nanoparticles: Mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications and toxicity effects*, Springer Link, **Vol. 10**, (2012)
- [13] <http://news.rice.edu/2012/07/11/ions-not-particles-make-silver-toxic-to-bacteria-3/> (Prostup: 02.07.2017.)
- [14] H.Plaza, *Antimicrobial polymers with metal nanoparticles*, International Journal of Molecular Sciences, **Vol.16**, Santiago (2014)
- [15] N.Zherebtsov, N.Malyshenko, V.Bryukhovetskaya, Z.Ismagilov, *Modified humic acids from lignite*, Coke and Chemistry, **Vol.58**, Kemerovo (2015)
- [16] C.Chlou, J.F.Lee, S.Boyd, *The surface area of soil organic matter*, Environ.Sci.Technol., **Vol. 24**, 1164-1166, Denver (1990)

- [17] F.H. Frimmel, G.Abbt-Braun, K.G. Heumann, B.Hock, H.D. Ludemann, M.Spiteller, *Refractory Organic Substances in the Environment*, Wiley-VCH, Karlsruhe (2002), 302-216
- [18] <https://www.slideshare.net/cordovasc/soil-organo-mineral-complexes-ppt>
(Pristup:01.07.2017.)
- [19] B.Gomes de Melo, F.Motta, M.H. Santana, *Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments*, ScienceDirect, **Vol. 62**, Campinas (2016)
- [20] T.Seki, Y. Suzuki, *A new method for the removal of toxic metal ions from acid-sensitive biomaterial*, J. Colloid Interface Sci, **Vol.190** (1997)
- [21] B.Welz, M.Sperling, *Atomic Absorption Spectrometry*, 3.izdanje, Wiley-VCH, Augsburg, (1999) 335-475
- [22] D.Derrick, *Thermal Gravimetric Analysis*, priručnik, Birmingham (2005)
- [23] Thermo Nicolet Corporation, *Introduction to fourier transform infrared spectroscopy*, priručnik, (2001)
- [24] J.Goldstein, D.Newbury, D.Joy, C.Lyman, P.Echlin, E.Lifshin, L.Sawyer, J.Michael, *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*, Springer Science, New York, (2003) 21-56
- [25] U.Pietsch, V.Holy, T.Baumbach, *High Resolution X-ray Scattering: From thin film to Lateral Nanostructures*, 2.izdanje, Springer, New York, (1999) 5-17

10. ŽIVOTOPIS

Mia Zaračko [REDACTED] 2012. godine završava Gimnaziju Lucijana Vranjanina, opći smjer, te iste godine upisuje preddiplomski studij Primijenjene kemije na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Po završetku preddiplomskog studija, nastavlja se usavršavati na matičnom fakultetu gdje upisuje diplomski studij Primijenjene kemije, modul Specifični materijali i napredne tehnologije. U sklopu CEEPUS programa mobilnosti 2017. godine boravila je tri mjeseca na sveučilištu Nikole Kopernika u Torunu, Poljska.